



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS DE ANESTÉSICOS GERAIS UTILIZADOS EM CIRURGIAS
EXPERIMENTAIS EM RATOS SUBMETIDOS A TESTES PREDITIVOS DE EFEITO
ANSIOLÍTICO E ANTIDEPRESSIVO**

LETÍCIA SANTOS HERBST

VITÓRIA

2017



Letícia Santos Herbst

**EFEITOS DE ANESTÉSICOS GERAIS UTILIZADOS EM CIRURGIAS
EXPERIMENTAIS EM RATOS SUBMETIDOS A TESTES PREDITIVOS DE EFEITO
ANSIOLÍTICO E ANTIDEPRESSIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Beijamini Harres

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Nivea Sampaio

Vitória

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

H534e Herbst, Leticia Santos, 1991 -
EFEITOS DE ANESTÉSICOS GERAIS UTILIZADOS EM CIRURGIAS
EXPERIMENTAIS EM RATOS SUBMETIDOS A TESTES PREDITIVOS DE
EFEITO ANSIOLÍTICO E ANTIDEPRESSIVO / Leticia Santos Herbst – 2017.
67 f. : il.

Orientador: Vanessa Beijamini Harres.
Coorientador: Karla Nívea Sampaio.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Comportamento. 2. Depressão. 3. Ansiedade. 4. Anestesia Geral.
I. Harres, Vanessa Beijamini. II. Sampaio, Karla Nívea. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 615

Letícia Santos Herbst

**EFEITOS DE ANESTÉSICOS GERAIS UTILIZADOS EM
CIRURGIAS EXPERIMENTAIS EM RATOS SUBMETIDOS A
TESTES PREDITIVOS DE EFEITO ANSIOLÍTICO E
ANTIDEPRESSIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27 de março de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Vanessa Beijamini Harres
Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFES
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Samia Regiane Lourenço Joca
Departamento de Física e Química – FCFRP-USP

Dr. Cláudio Côrrea Natalini
Pesquisador do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA

Aos meus pais e a meu marido, por
acreditarem em mim.

*“Na vida não existe nada a se temer,
apenas a ser compreendido”.*

Marie Curie.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter aberto essa porta, por ter me guiado e me dado forças até aqui.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Vanessa Beijamini Harres que me direcionou, ensinou, e sempre esteve pronta a ajudar, posso dizer que eu realmente fui muito bem orientada.

A minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Karla Nívea Sampaio, que foi muito prestativa e contribuiu com seus conhecimentos para que eu chegasse até aqui.

Aos membros que compuseram a banca Prof.^a Dr.^a Samia Regiane Lourenço Joca e Dr. Cláudio Correa Natalini, por aceitarem avaliar com empenho e pela disponibilidade e contribuição para a melhoria deste trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

A todos os amigos e colegas do lab, em especial Alciene pela grande amiga que se tornou e por me ajudar nos momentos que precisei, Gabriela por me ajudar no início quando eu ainda estava “perdida” no laboratório, Sara, por compartilhar seus conhecimentos e me mostrar soluções nos meus momentos de desespero, a Tamires pela grande ajuda e pelas emoções (foram muitas) compartilhadas durante os experimentos, Anna Paula que apesar de ter chegado a tão pouco tempo já trouxe diversão e amizade pra o nosso laboratório, Eduardo pelas conversas e momentos de desabafo compartilhados, Vinícius por me aturar no laboratório o dia inteiro e pelos cafés de cada dia, Vitor, Igor, Thatiany, e os demais amigos do laboratório por compartilhar conhecimentos, momentos de descontração, de risos, de preocupação, mas principalmente pelo carinho e amizade de todos, (você são demais!).

Ao meu marido Ramon, pelo incentivo, por toda ajuda quando eu precisei, principalmente para fazer o serviço pesado quando eu precisava pegar material para os ratos, por providenciar comida tarde da noite quando eu ficava o tempo todo escrevendo minha dissertação, mas principalmente por me aturar nos momentos de chatices (quando muita coisa eu acabava descontando nele!).

A minha irmã, Sara por ser minha plateia quando eu precisava treinar alguma apresentação, também me dar força quando eu precisei, seu jeito de me ouvir foi fundamental para que eu não entrasse em desespero quando algo dava errado.

Aos meus pais pelo incentivo e apoio, por acreditarem em mim, foram o impulso para que eu procurasse crescer em conhecimento.

Também aos meus amigos pessoais, Verônica, Talita e Diorge que mesmo sem fazer parte da minha vida acadêmica acompanharam meu caminho até aqui, sempre estiveram ao meu lado, mostrando preocupação, me oferecendo ajuda e me apoiando nos meus momentos psicologicamente frágeis.

Aos demais amigos e familiares por todo apoio e por entenderem a minha ausência

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, o meu muito obrigada!

RESUMO

Na psicofarmacologia, cirurgias estereotáxicas para implantação de cânulas ou eletrodos no sistema nervoso central (SNC) são comumente empregadas antes da avaliação comportamental em modelos animais. Dessa forma, a anestesia e analgesia se fazem necessárias. Estudos prévios mostraram que anestésicos gerais como a cetamina induziram efeito antidepressivo rápido e persistente e efeito ansiolítico. Assim, foi avaliado se outros anestésicos gerais frequentemente utilizados em estudos de psicofarmacologia podem afetar comportamentos em testes preditivos de efeito antidepressivo ou ansiolítico, comprometendo a interpretação de dados experimentais de outros estudos. Diante disso, um dos objetivos do estudo foi avaliar possíveis alterações comportamentais induzidas pelo tribromoetanol, hidrato de cloral, tiopental e isoflurano em ratos submetidos ao Teste do Nado Forçado (TNF) e ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Em um segundo grupo de experimentos, investigamos se a dose anestésica dos anestésicos que não afetaram o comportamento no primeiro experimento poderia interferir na detecção do efeito antidepressivo da imipramina ou do efeito ansiolítico do diazepam em ratos submetidos ao TNF ou ao LCE, respectivamente. Ratos Wistar machos receberam uma única injeção por via intraperitoneal de doses subanestésicas ou anestésica de hidrato de cloral (50, 150 e 400 mg/kg); de tribromoetanol (40, 90 e 250 mg/kg) e de tiopental (05,10 e 40mg/kg), enquanto os grupos controle receberam salina. O isoflurano foi administrado por via inalatória em concentrações anestésicas (4% para indução e 2% para manutenção) ou subanestésicas (0,5 ou 1,5%) e o respectivo grupo controle recebeu ar. Os animais foram testados no TNF 2 horas e 7 dias após a injeção. Grupos independentes de animais foram testados no LCE e no Campo Aberto (CA) 2 horas ou 7 dias após a administração dos anestésicos. Nenhuma das doses de tribromoetanol afetou o comportamento de forma aguda (2h) ou persistente (7 dias) no TNF. A dose subanestésica de tribromoetanol (90mg/kg) aumentou a exploração dos braços abertos no LCE, indicando um efeito ansiolítico agudo, enquanto a dose anestésica (250mg/kg) diminuiu a exploração nos braços abertos 7 dias após o tratamento, sugerindo um efeito ansiogênico tardio. A dose subanestésica do hidrato de cloral (150mg/kg)

reduziu o tempo de imobilidade no TNF de forma aguda, sugerindo um efeito tipo-antidepressivo. Já a dose anestésica do hidrato de cloral (400mg/kg) aumentou a exploração dos braços abertos do LCE 2 horas e 7 dias após o tratamento, sugerindo um efeito ansiolítico agudo e persistente. A dose anestésica do tiopental (40mg/kg) reduziu agudamente o tempo e a frequência de imobilidade e aumentou a natação no TNF, sugerindo um efeito tipo-antidepressivo agudo. O tiopental não apresentou efeito em animais testados no LCE. Ainda, o isoflurano não apresentou efeito no TNF ou no LCE. O tribromoetanol, o hidrato de cloral, o tiopental e o isoflurano, administrados 7 dias antes do TNF, não interferiram na detecção do efeito antidepressivo da imipramina. O tiopental ou o isoflurano também não interferiram na detecção do efeito ansiolítico do diazepam. Assim, os resultados obtidos sugerem que o tribromoetanol e o hidrato de cloral são anestésicos impróprios para utilização em cirurgias que precedem testes comportamentais relacionados com ansiedade, enquanto o isoflurano e o tiopental se mostraram adequados para a utilização em testes preditivos para drogas com efeito na depressão ou ansiedade. As doses subanestésicas do Tribromoetanol (90mg/Kg) e do Hidrato de Cloral (150mg/kg) mostraram um possível efeito ansiolítico agudo e antidepressivo agudo, respectivamente,, sugerindo que essas drogas podem ser alvo de futuros estudos para o desenvolvimento de potenciais novos fármacos para o tratamento de depressão e de transtornos de ansiedade.

ABSTRACT

In experimental psychopharmacology, the behavioral evaluation is often preceded by stereotactic surgery to insert cannulas or electrodes in the central nervous system. During these surgeries, the rodents receive anesthetic and analgesic drugs to prevent unnecessary suffering. Previous studies showed that some general anesthetics, such as ketamine, induce acute and persistent antidepressant and anxiolytic-like effects. In this way, we evaluated whether other general anesthetics would also affect behaviors that would compromise the experimental data interpretation of other studies. Thus, we evaluate if tribromoethanol, chloral hydrate, thiopental and isoflurano would change behavior of animals submitted to the Forced Swimming Test (FST) and to the Elevated Plus-Maze (EPM). In a second experiment, we evaluate if an anesthetic dose of anesthetics that did not affect the analyzed behavior in the first experiment, could interfere with the detection of the antidepressant (imipramine) or anxiolytic (diazepam) effects in rats subjected to the TNF or LCE, respectively. Adult Wistar rats were intraperitoneally injected (single injection) with subanesthetic and anesthetic doses of chloral hydrate (50, 150 and 400 mg/kg); tribromoethanol (40, 90, and 250 mg/kg) or thiopental (05, 15 and 40 mg/kg). The control group received saline injections. Isoflurane was administered by inhalation in anesthetic dose (4% to induction and 2% for maintenance) or in subanesthetic doses (0,5, 1,5%), and the control group received air. The animals were tested in the FST 2 h and 7 days after injections. Independent groups of animals were tested in the EPM and in the open field (OF) 2 hours or 7 days after injection of the anesthetics. Tribromoethanol did not acutely (2h) or persistently (7 days) affect behaviors in the FST. Tribromoethanol (90mg/kg) increased exploration of the open arms in the EPM, indicating an acute anxiolytic-like effect. The anesthetic dose of tribromoethanol (250mg/kg) decreased the open arms exploration in the EPM 7 days after treatment, suggesting a delayed anxiogenic-like effect. A subanesthetic dose of chloral hydrate (150 mg/kg) reduced immobility time in the FST only acutely, suggesting an antidepressant-like effect. The anesthetic dose of chloral hydrate (400mg/kg) raised the exploration of the open arms in the EPM 2 h and 7 days after treatment, suggesting an acute and persistent anxiolytic-like effect. The anesthetic dose of thiopental (40mg/kg) acutely reduced immobility time and frequency in the FST, suggesting an antidepressant-like effect. Thiopental did not

affect behaviors in the EPM. Isoflurano did not present any effect on behavior of TNF or EPM. The general anesthetics did not interfere in the detection of the antidepressant or anxiolytic effect of imipramine or diazepam, respectively. Our results showed that tribromoethanol and chloral hydrate are improper anesthetics in surgeries that precede behavioral tests related to anxiety, while isoflurane and thiopental proved to be suitable for use in these tests. The subanesthetic doses of tribromoethanol (90mg/kg) and chloral hydrate (150mg/kg) induce acute anxiolytic and antidepressant-like effects, respectively, while an anesthetic dose of thiopental induced acute antidepressant effect, suggesting that these drugs may be target of future studies for developing potential new medicine to treat anxiety and depression disorders.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do tribromoetanol.....	11
Figura 2 – Estrutura química do hidrato de cloral.....	12
Figura 3 – Estrutura química do tiopental.....	14
Figura 4 – Estrutura química do isoflurano.....	16
Figura 5 – Procedimento experimental do primeiro grupo de experimentos.....	26
Figura 6 – Procedimento experimental do segundo grupo de experimentos.....	27
Figura 7 – Efeito do tribromoetanol em ratos testados no teste do nado forçado.....	30
Figura 8 – Efeito do tribromoetanol em ratos testados no LCE.....	32
Figura 9 – Efeito do hidrato de cloral em ratos testados no teste do nado forçado...	33
Figura 10 – Efeito do hidrato de cloral em ratos testados no LCE.....	35
Figura 11– Efeito da imipramina em ratos tratados com tribromoetanol ou hidrato de cloral 7 dias antes do teste do nado forçado.....	37
Figura 12 – Efeito do tiopental em ratos testados no teste do nado forçado.....	38
Figura 13 – Efeito do tiopental em ratos testados no LCE.....	40
Figura 14 – Efeito ansiolítico do diazepam no LCE em ratos tratados previamente (7 dias antes) com tiopental.....	41
Figura 15 – Efeito do isoflurano em ratos testados no teste do nado forçado.....	42
Figura 16 – Efeito do isoflurano em ratos testados no LCE.....	43
Figura 17– Efeito da Imipramina em ratos tratados com isoflurano 7 dias antes do teste do nado forçado.....	44
Figura 18 – Efeito ansiolítico do diazepam no LCE em ratos tratados previamente (7 dias antes) com isoflurano.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dose, latência para indução e duração da anestesia dos anestésicos gerais utilizados selecionados para o estudo.....	9
Tabela 2 - Distância percorrida no Campo Aberto (em m) por ratos 2 horas após a administração do anestésico.....	46
Tabela 3 - Distância percorrida no Campo Aberto (em m) por ratos 7 dias após a administração do anestésico.....	47
Tabela 4 - Distância percorrida no Campo Aberto (em m) por ratos tratados com diazepam ou salina 7 dias após a administração do anestésico.....	48
Tabela 5 - Efeito dos anestésicos avaliados.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
1.1	TRIBROMOETANOL.....	10
1.2	HIDRATO DE CLORAL.....	12
1.3	TIOPENTAL	14
1.1	ISOFLURANO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	ANIMAIS	19
3.2	DROGAS E EQUIPAMENTOS.....	19
3.3	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	20
3.3.1	Teste do Nado Forçado (TNF).....	20
3.3.2	Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	21
3.3.3	Campo aberto (CA).....	21
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS.....	22
3.5	ANÁLISE DE DADOS	27
4	RESULTADOS	29
5	DISCUSSÃO.....	49
5.1	TRIBROMOETANOL.....	50
5.2	HIDRATO DE CLORAL.....	52
5.3	TIOPENTAL	54
5.4	ISOFLURANO.....	56
5.5	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	57
6	CONCLUSÃO	59

REFERÊNCIAS60

1 INTRODUÇÃO

Modelos animais são frequentemente utilizados para o entendimento de organismos vivos e da fisiopatologia de diversas doenças, muitas vezes com o objetivo de desenvolver novas estratégias terapêuticas (FLECKNELL, 1988; STOKES et al, 2009). Procedimentos como a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas ou eletrodos no sistema nervoso central (SNC) são ferramentas fundamentais para o entendimento de bases moleculares e neurais no desenvolvimento comportamental (YOSHIDA et al., 2015). Esse procedimento experimental, assim como vários outros, é invasivo e causa estresse ou dor, de forma que a anestesia e analgesia se fazem necessárias e devem ser adequadas as diferentes circunstâncias experimentais. Além disso, a intensidade da anestesia e seus potenciais efeitos adversos, como hipotermia, depressão cardiovascular ou respiratória, devem ser levados em consideração na escolha do anestésico a ser empregado (ARRAS et al., 2001, BUITRAGO et al., 2008).

A anestesia geral consiste na perda de consciência, analgesia, relaxamento muscular e supressão dos reflexos (FLECKNELL, 2009). Porém, a combinação de vários agentes pode contribuir para uma anestesia geral adequada. De acordo com Gargiulo et al. (2012), é considerado um anestésico ideal aquele que causa poucos efeitos colaterais, promove uma imobilização rápida e adequada, é reversível e seguro para o animal e manipuladores e ainda ofereça facilidade de aplicação.

Os anestésicos gerais agem principalmente modulando positivamente ou negativamente os receptores acoplados à canais iônicos, por exemplo facilitando a neurotransmissão gabaérgica e bloqueando a neurotransmissão glutamatérgica (FLOOD; KRASOWSKI, 2015; KRASOWSKI & HARRISON, 2000; DICKINSON et al., 2007).

Os anestésicos gerais podem ser classificados de acordo com a via de administração como injetáveis ou inalatórios (FLECKNELL, 1988). Os anestésicos injetáveis geralmente são de baixo custo,, dessa forma são frequentemente utilizados em cirurgias laboratoriais em animais de pequeno porte como os roedores (ARRAS et al., 2001; BUITRAGO et al., 2008). Porém existe a dificuldade de escolha da dose inicial para modular com precisão a

profundidade da anestesia, além de acentuadas alterações na frequência cardíaca e respiratória (GARGIULO et al., 2012). Já os anestésicos inalatórios causam uma menor depressão cardiovascular, menor impacto sobre as funções hepática e renal e permitem uma fácil manutenção do plano anestésico, proporcionando maior segurança em comparação com os anestésicos injetáveis (JANSSEN et al., 2004; ROTH et al., 2002; ZUURBIER et al. 2002). Porém, os anestésicos inalatórios podem causar severa depressão respiratória e hipotensão, além de serem anestésicos de alto custo (BUIRAGO et al., 2008; CESAROVIC et al., 2010).

Estudos com o anestésico geral cetamina mostraram que a administração de doses subanestésicas desse anestésico induzem um efeito tipo antidepressivo rápido e persistente em animais (MAENG et al., 2008; YILMAZ et al. 2002). A cetamina também mostrou efeito ansiolítico agudo em doses subanestésicas no teste do labirinto em cruz elevado (ENGIN et al. 2009). Ainda, em estudos com doses anestésicas e subanestésicas de cetamina foi observado um possível efeito tipo panicolítico agudo e persistente no teste do labirinto em T (SILOTE, 2013). Além disso, estudos em humanos mostraram que a cetamina em doses subanestésicas apresentou efeito antidepressivo rápido e persistente e ansiolítico (BERMAN et al., 2000; ZARATE et al., 2006 (IRWIN; IGLEWICZ, 2010; FEDER et al., 2015)

Considerando que nos estudos da neuropsicofarmacologia são comumente empregados procedimentos cirúrgicos que antecedem a avaliação do comportamento dos animais e que estudos pré-clínicos mostraram que o anestésico geral cetamina altera alguns comportamentos, surgiu então a necessidade de avaliar se outros anestésicos gerais também alterariam comportamentos relacionados com depressão e/ou ansiedade, o que poderia comprometer a interpretação de dados experimentais. Além disso, é possível que os anestésicos gerais possam apontar vias a serem investigadas para novas classes de drogas antidepressivas e/ou ansiolíticas.

Assim, os anestésicos aqui utilizados foram escolhidos por serem comumente utilizados em procedimentos experimentais. Stokes e colaboradores (2009) mostraram que os anestésicos gerais cetamina, hidrato de cloral e isoflurano estão entre os mais frequentemente utilizados em experimentos com roedores.

O tribromoetanol tem sido o anestésico de escolha para produção de animais geneticamente modificados, além de não interferir na avaliação de diferentes parâmetros laboratoriais como avaliações psicoacústicas e cardiovasculares (PAPAIOANNOU & FOX, 1993; ARRAS et al., 2001; MAHERAS & GOW, 2013; PACHON et al., 2015). Já o tiopental tem sido o anestésico de menor impacto em procedimentos que se deseja manter as funções cardíacas e respiratórias intactas, e também em procedimentos em que se deseja um efeito neuroprotetor (SUMITRA et al., 2004; ZORNIK et al., 2010; KOSE et al., 2012; TAGAWA & SAKURABA, 2014; GONCA, 2015). Na tabela 1 estão descritos os anestésicos que foram investigados em nosso estudo, bem como as doses anestésicas utilizadas, a latência para indução e a duração da anestesia.

Tabela 1 - Dose, latência para indução e duração da anestesia dos anestésicos gerais utilizados selecionados para o estudo

DROGA	ESPÉCIE UTILIZADA	DOSE ANESTÉSICA UTILIZADA	LATÊNCIA PARA INDUÇÃO DA ANESTESIA	DURAÇÃO DA ANESTESIA	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	REFERÊNCIA
Tribromoetanol	Ratos Sprague-Dawley	250mg/kg	-	16-20 min.	i.p.	(AJADI et al., 2013)
	Camundongos	375mg/kg	-	25-30 min.	i.p.	(MAHERAS; GOW, 2013)
	Ratos Sprague-Dawley	400mg/kg	Aprox. 1 min. 5min.	Aprox. 10 min. 25-30 min.	i.p.	(GOPALAN et al., 2005)
	Camundongo	450mg/kg	-	-	i.p.	(ZELLER et al., 1998)
	Ratos Crl: CD(BR)	300mg/Kg	4, 2min.	64,6min.	i.p.	(FIELDI; WHITE; LANG, 1993)
Hidrato de Cloral	Ratos Wistar	300mg/Kg	-	90 min.	i.p.	(MAUD et al., 2014)
	Ratos Crl:	400mg/Kg	2,9min.	111,5min.	i.p.	(FIELDI; WHITE; LANG,

	CD(BR)					1993)
	Ratos Sprague-Dawley	400mg/Kg	-	30-90min.	i.p.	(VACHON et al., 2000)
	Ratos Crl: CD(BR)	450mg/Kg	3,1min.	136,6min.	i.p.	(FIELDI; WHITE; LANG, 1993)
Tiopental	Ratos Wistar	30mg/kg	-	-	i.m.	(KOSE et al., 2012)
	Ratos Wistar	40mg/kg	-	-	i.p.	(SUMITRA et al., 2004)
	Ratos Sprague-Dawley	50mg/kg	-	-	i.p.	(EL-MAS; ABDEL-RAHMAN, 1997)
	Ratos Wistar	100mg/kg	-	Maior que 30 min.	i.p	(PASTUSZKO, 1980)
Isoflura-no	Camundon gos	1%	-	-	Inalatória	(GARGIULO et al., 2012)
	Ratos Sprague-Dawley	1,1%	30min.	-	Inalatória	(LI; ZUO, 2009)
	Ratos Sprague-Dawley	2,2%	30min.	-	Inalatória	(LI; ZUO, 2009)
	Camundon gos	3%	-	-	Inalatória	(GARGIULO et al., 2012)
	Ratos Wistar	4% (indução) 2% (manutenção)	-	20 min.	Inalatória	(MAUD et al., 2014)

1.1 TRIBROMOETANOL

O tribromoetanol é um álcool primário (figura 1) que foi inicialmente utilizado em animais e em humanos por via retal, porém seu uso em humanos foi suspenso por causar hepatotoxicidade (KRASOWSKI & HARRISON, 2000; BOLLIGER & MADDOX, 1989). É um anestésico geral de curta ação tipicamente utilizado para indução da anestesia durante cirurgias em roedores e em procedimentos como o

desenvolvimento de animais transgênicos (REID et al., 1999; ZELLER et al., 1998).

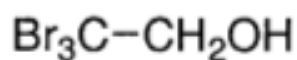


Figura 1 – Estrutura química do tribromoetanol

Fonte: Krasowski & Harrison (2000)

De acordo com Zeller et al., (1998) e Maheras & Gow, (2013), o tribromoetanol proporciona uma anestesia eficaz e com segurança em doses terapêuticas por promover uma rápida indução, recuperação e profundidade adequada da anestesia, bom relaxamento muscular e baixa mortalidade. Já Meyer & Fish, (2005) relataram depressão generalizada no SNC de animais após o uso do tribromoetanol. O uso de altas doses do tribromoetanol em camundongos pode induzir inflamações e necrose das paredes abdominais e, ocasionalmente, na superfície de órgãos abdominais, além de vasodilatação intestinal (ZELLER et al., 1998). Porém, não foram observados esses efeitos adversos quando somente uma dose desse anestésico foi administrada (MAHERAS & GOW, 2013).

Zeller et al., (1998), utilizando diferentes diluições desse anestésico (1,2% e 2,5%), observaram que as lesões abdominais causadas são dependentes da concentração da solução da droga administrada. Também de acordo com Meyer & Fish, (2005), a preparação e estocagem imprópria do tribromoetanol possibilita a ocorrência de muitos desses efeitos adversos. O tribromoetanol, na presença de luz e umidade, se decompõe em dibromoacetaldeído e ácido bromídrico, que diminuem o pH da solução e são potentes irritantes gastrointestinais (LIEGGI et al., 2005).

O tribromoetanol tem ação parecida com a de outros alcoóis anestésicos que potencializam os efeitos dos receptores GABA_A, dos receptores de glicina e dos receptores 5-HT₃, assim como bloqueiam os receptores nicotínicos e os receptores AMPA, Kainato e NMDA (THOMPSON & WAFFORD, 2001; KRASOWSKI & HARRISON, 1999; MIHIC et al., 1997).

O tribromoetanol é metabolizado no fígado, onde sofre uma reação de conjugação com ácido glicurônico e, em seguida, é excretado pela urina como tribromoetanol glicuronato (FISH, 1998).

Não foram encontradas na literatura evidências sobre possíveis efeitos comportamentais provocados pelo uso do tribromoetanol. Porém, foi observado que interneurônios gabaérgicos exercem uma influência regulatória sobre neurotransmissões monoaminérgicas e serotoninérgicas, que estão alteradas em distúrbios afetivos como a depressão (BRAMBILLA et al., 2003; PEHRSON; SANCHEZ, 2015). Dentro disso, como o tribromoetanol potencializa a neurotransmissão gabaérgica, é possível que esse anestésico tenha efeito em testes preditivos de efeito antidepressivo. Além disso, espera-se que o tribromoetanol tenha efeito ansiolítico, também devido à ação desse anestésico em receptores GABA_A, que são alvo para drogas com efeito ansiolítico como o diazepam (MÖHLER et al, 2002).

1.2 HIDRATO DE CLORAL

O hidrato de cloral tem sido utilizado desde 1869 em baixas doses como hipnótico sedativo e em altas doses como anestésico (FISCHER et al. 2000). É um hidrocarboneto alifático halogenado derivado do tricloroetileno e do tetracloroetileno (LAURENT et al., 2006) (Fig.2).

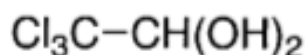


Figura 2 – Estrutura química do hidrato de cloral

Fonte: Krasowski & Harrison (2000)

Uma das vantagens descritas com o uso dessa droga foi um tempo relativamente prolongado de anestesia efetiva, ideal para procedimentos longos sem necessidade de reanestesia (FIELDI et al. 1993). Doses típicas do hidrato de cloral (300 a 400mg/kg) geram anestesia suficiente em procedimentos longos (FIELDI et al. 1993). Estudos feitos por Fieldi e colaboradores (1993) mostraram

uma rápida indução e recuperação da anestesia com uso do hidrato de cloral, e a duração da anestesia de forma dose-dependente.

Já de acordo com Maheras & Gow, (2013) e Fieldi et al (1993), o hidrato de cloral não é considerado um anestésico ideal para roedores por causar efeitos adversos graves. O hidrato de cloral não promove uma anestesia profunda, tem pouco efeito analgésico e poder induzir uma profunda depressão cardíaca e respiratória, de uma forma dose-dependente (MAHERAS & GOW, 2013; FIELDI et al. 1993).

Ainda, dentre os efeitos adversos causados pelo hidrato de cloral quando administrado por via intraperitoneal estão irritação, inflamação, necrose de partes dos órgãos abdominais e íleo adnâmico (VACHON et al., 2000). O hidrato de cloral também tem sido associado com hepatocarcinogenicidade e cardiotoxicidade (CHIU et al., 2006). Entretanto, os efeitos severos dessa droga parecer estar relacionados com a utilização de altas doses (Fieldi et al. 1993). Nesse sentido, Vachon et al., (2000), com o objetivo de diminuir alguns efeitos adversos causados por uma única administração de hidrato de cloral, utilizaram a droga na dose de 400mg/Kg preparada em diferentes concentrações (40 mg/ml e 80 mg/ml). Os resultados mostraram irritações abdominais significativamente diminuídas e melhora no funcionamento intestinal com a utilização da forma menos concentrada da droga em relação a forma mais concentrada (VACHON et al., 2000). Nesse sentido, procedimentos com uma diluição maior da solução da droga e a não utilização de doses repetidas proporcionam maior segurança no uso do hidrato de cloral.

O hidrato de cloral tem ação sobre a neurotransmissão gabaérgica, provavelmente por potencializar a função dos receptores GABA_A (LOVINGER et al., 1993). Também potencializa receptores para glicina e facilita a neurotransmissão serotoninérgica mediada por receptores 5-HT₃ (DOWNIE et al., 1995; KRASOWSKI & HARRISON, 1999). De acordo com Fischer et al (2000), o hidrato de cloral e seu metabólito ativo, tricloroetanol, inibem a entrada de cálcio via receptores AMPA e receptores NMDA de forma dose-dependente (FISCHER et al 2000).

O hidrato de cloral é rapidamente reduzido no fígado pela álcool desidrogenase em tricloroetanol, seu metabólito ativo (SING et al., 1996; LAURENT et al.,

2006). Uma parte das moléculas é oxidada a ácido tricloroacético pela aldeído desidrogenase (SING et al., 1996).

O hidrato de cloral, em doses subanestésicas, parece induzir também efeito ansiolítico em testes realizados em roedores cerca de 30 minutos após a aplicação (ARON et al., 1971; PRUHS et al., 1988; GLADNEY et al. 1994). O hidrato de cloral também age potencializando a neurotransmissão gabaérgica que parece estar envolvida na fisiopatologia da depressão (BRAMBILLA et al., 2003; PEHRSON & SANCHEZ, 2015). Assim pode ser que esse anestésico tenha efeito em modelos preditivos para drogas com efeito na depressão e ansiedade.

1.3 TIOPENTAL

O tiopental faz parte da classe dos barbitúricos (ver estrutura na figura 3) que são utilizados clinicamente como hipnótico-sedativos, anticonvulsivantes e para indução de anestesia (YASHIKI et al., 1987; DOWNIE et al, 2000; TANELIAN et al., 1993). Ele foi o primeiro barbitúrico considerado realmente adequado para a anestesia geral por seus efeitos no SNC se iniciarem rapidamente após sua administração, apresentando uma duração de ação ultra curta (GEPTS & CAMU, 1991).

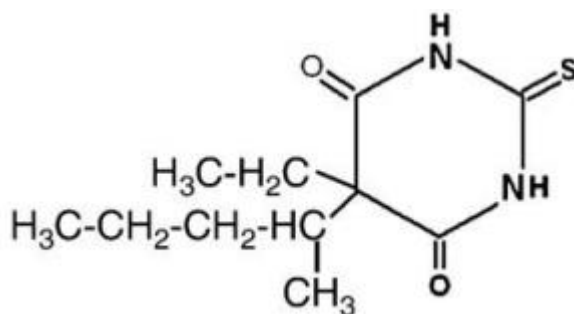


Figura 3 – Estrutura química do tiopental

Fonte: Mandal & Pettegrew (2008)

O tiopental tem uma boa ação indutora do sono por remover a ansiedade e tensão emocional, apresenta propriedade de neuroproteção cerebral, e é

utilizado para reduzir a pressão intracraniana (HAEFELY, 1977; DEWHURST; et al., 2002). Porém, assim como outros barbitúricos, pode causar hipertensão transitória seguida de profunda hipotensão e pode ser letal quando administrado em doses acima da janela terapêutica (HAEFELY, 1977; HARRIS et al., 2006; KRASOWSKI; HARRISON, 1999)

Barbitúricos como o tiopental aumentam a afinidade do GABA pelos receptores GABA_A, fazendo com que neurotransmissão gabaérgica seja facilitada. Os barbitúricos também potencializam a ligação da glicina aos receptores de glicina, tem efeito sobre neurônios serotoninérgicos, agem bloqueando receptores nicotínicos, AMPA, Kainato e inibem a liberação de glutamato (TANELIAN, et al., 1993; KRASOWSKI & HARRISON, 1999; DOWNIE et al., 2000; ZHAN et al., 1998; OZKAN; KUSCU et al., 2015).

O tiopental é utilizado cirurgicamente na sua forma racêmica de uma mistura equimolar dos seus isômeros ópticos, R(+) e S(-) enantiômeros. O enantiômero S(-) é cerca de 2 vezes mais potente que o enantiômero R(+) para suprimir os reflexos em roedores (HALEY & GIDLEY, 1976).

O tiopental é distribuído primeiramente para os tecidos ricos em vasos sanguíneos como cérebro, rins, fígado, pulmão e coração. Depois, é redistribuído para tecidos magros como músculos e mais tardiamente para tecidos gordurosos (GEPTS & CAMU, 1991). O término do efeito anestésico é entre 15- 20 minutos (GEPTS & CAMU, 1991). O tiopental é metabolizado no fígado através de reação de oxidação (GEPTS & CAMU, 1991). Também sofre desulfuração gerando um metabólito ativo, o pentobarbital (SANSKI et al., 1980). Seus metabólitos inativos são eliminados pelos rins (GEPTS & CAMU, 1991). Somente uma pequena quantidade do fármaco inalterado é excretado pela urina (GEPTS & CAMU, 1991).

Nossa hipótese é de que o tiopental apresente efeito ansiolítico, já que King e Little (1954) mostraram que o tiopental, em doses anestésicas, agiu como ansiolítico em pacientes tratados cronicamente com esse anestésico. Além disso, Haefely (1977) mostrou que os barbitúricos em baixas doses diminuíram estados de tensão e ansiedade. Além disso, é possível que o tiopental apresente efeito na depressão, uma vez que esse anestésico potencializa a neurotransmissão gabaérgica e drogas com efeito antidepressivo parecem atuar

potencializando essa neurotransmissão (BRAMBILLA et al., 2003; PEHRSON & SANCHEZ, 2015).

1.1 ISOFLURANO

O isoflurano é um anestésico volátil halogenado, utilizado como anestésico inalatório (AL-MOUSAWI et al., 2010) (Fig. 4). Tem sido anestésico de escolha tanto para procedimentos de curta quanto de longa duração por oferecer grandes vantagens no controle da anestesia (GARGIULO et al., 2012).

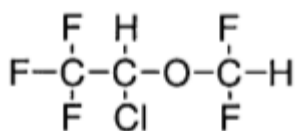


Figura 4 – Estrutura química do isoflurano

Fonte: Krasowski & Harrison (2000)

Anestésicos inalatórios como o isoflurano são mais seguros principalmente para procedimentos prolongados, por permitirem a manutenção da profundidade da anestesia (GARGIULO et al., 2012; SMITH, 1993; MAUD et al., 2014). Além disso, o isoflurano promove uma rápida indução e recuperação da anestesia, causa mínima depressão cardiovascular e seu impacto nas funções hepáticas e renais é reduzido (GARGIULO et al., 2012; MAUD et al., 2014). Também apresenta um leve efeito analgésico que é um importante critério preconizado pelos comitês de ética animais, além de promover efeitos de neuroproteção (MAUD et al., 2014; ZAUSINGER et al., 2002; LEE et al., 2008).

Entretanto, o isoflurano pode causar severa depressão respiratória, vasodilatação e hipotensão de forma dose-dependente (GARGIULO et al., 2012). Adicionalmente, para a aplicação de anestésicos inalatórios são necessários equipamentos que incluem vaporizadores de precisão, medidores de vazão, sistemas de respiração específicos e sistemas de exaustão para prevenir a poluição do ambiente (GARGIULO et al., 2012). Esses equipamentos

quando utilizados para anestesia inalatória controlada, elevam o custo desse tipo de anestesia, além de que o próprio anestésico inalatório tem um custo elevado.

O isoflurano age como antagonista competitivo de receptores NMDA, e bloqueando os locais de ligação da glicina (DICKINSON et al., 2007). Também bloqueia receptores nicotínicos e muscarínicos e facilita receptores GABA_A (VIOLET et al., 1997; MIHIC et al., 1997; HARRISON et al., 1993).

O isoflurano é constituído de isômeros ópticos R (-) e S(+) (DICKINSON et al., 1994). É utilizado clinicamente como mistura racêmica (ZHANG et al., 2009), sendo que o isômero S (+) promove efeitos cerca de duas vezes mais potente que o isômero R (-) (MOODY et al., 1993).

A absorção e eliminação do isoflurano ocorrem através dos pulmões, o que garante uma rápida indução e recuperação da anestesia (GARGIULO et al., 2012).

Um estudo realizado por Antila et al., (2014), mostrou que a anestesia com isoflurano promoveu efeito tipo antidepressivo de forma aguda e após 2 semanas no teste do nado forçado (TNF). Seu efeito rápido e persistente se assemelha ao da cetamina e parece estar relacionado com a neuroplasticidade estrutural induzida por essa droga (ANTILA et al., 2014). Porém, Yonezaki e colaboradores (2015), não encontraram efeito em modelos de ansiedade ou preditivos de efeito antidepressivo em ratos tratados com isoflurano. Além disso, o isoflurano age potencializando a neurotransmissão gabaérgica, que está diminuída na depressão e é facilitada por algumas classes de drogas ansiolíticas. Dessa forma, é possível que o isoflurano apresente efeito tipo antidepressivo de forma aguda e persistente no teste do nado forçado, assim como efeito ansiolítico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se anestésicos gerais comumente utilizados em roedores durante procedimentos cirúrgicos alteram o comportamento de ratos submetidos a testes preditivos de efeito ansiolítico e antidepressivo.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar o possível efeito antidepressivo e/ou ansiolítico rápido e/ou persistente em ratos tratados agudamente com doses anestésicas ou subanestésicas de **tribromoetanol, hidrato de cloral, tiopental** ou **Isoflurano**.
- Avaliar se a administração prévia dos anestésicos **tribromoetanol, hidrato de cloral, tiopental** ou **isoflurano** interfere na detecção dos efeitos de um antidepressivo (imipramina) ou de um ansiolítico (diazepam).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos (280-350 g, n total = 567 animais), provenientes do Biotério Central da UFES, mantidos em grupos de 4 a 5 animais, à temperatura de 24 +- 2°C, com ciclo claro-escuro de 12 x 12 horas tendo livre acesso à água e comida. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES), sob o número 58/2015.

3.2 DROGAS E EQUIPAMENTOS

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- Tribromoetanol (Sigma-Aldrich, MO, EUA) nas doses de 40, 90 e 250 mg/Kg (AJADI et al., 2013) diluída em salina e administrada no volume de 10ml/kg;
- Hidrato de cloral (VETEC, SP, Brasil) nas doses de 50, 150 e 400 mg/kg (VACHON et al., 2000) diluída em salina e administrada no volume de 10ml/kg;
- Tiopental sódico (Cristália, SP, Brasil) nas doses 5, 15 e 40 mg/kg (SUMITRA et al., 2004) diluída em salina e administrada no volume de 1ml/kg;
- Isoflurano (Cristália, SP, Brasil) nas concentrações de 0,5, 1,5 e 4% (MAUD et al., 2014) por via inalatória.
- Imipramina (Sigma-Aldrich, MO, EUA) na dose de 15 mg/kg diluída em salina e administrada no volume de 10ml/kg;
- Diazepam (Cristália, SP, Brasil) na dose de 2,5 mg/kg diluída em salina e administrada no volume de 10ml/kg;

As doses anestésicas dos anestésicos gerais foram baseadas em estudos prévios da literatura com as drogas a serem utilizadas (Tabela 1). As doses subanestésicas utilizadas foram baseadas nas doses subanestésicas utilizadas em estudos do nosso laboratório com a cetamina, calculando-se a

proporção aproximada de 15 e 35 % em relação às doses anestésicas de cada droga.

Para a administração do isoflurano foi utilizado um equipamento de anestesia inalatória da marca Bonther®, que consiste em um medidor de fluxo digital, um vaporizador universal, um filtro de cal sodada, mangueiras de silicone e uma caixa de indução onde o animal foi colocado para administração do anestésico. A administração foi feita em sala com temperatura ambiente variando entre 22 e 24 °C.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.3.1 Teste do Nado Forçado (TNF)

O aparelho utilizado foi um cilindro opaco (23 cm de diâmetro e 52 cm de altura), contendo água com temperatura variando entre 22 e 24°C. O nível de água utilizado foi o de 25 cm de forma que o animal não consiga tocar o fundo do recipiente com as patas traseiras e tampouco alcançar a borda superior com as patas dianteiras.

O teste foi realizado em 2 etapas. A primeira consiste em uma pré-exposição, onde o animal foi colocado no cilindro para nadar por 15 minutos. Os animais foram testados após 24 horas, durante 5 minutos para a mensuração do tempo de imobilidade, assim como da frequência de escalada, de natação e de imobilidade de acordo com o procedimento utilizado por Detke e colaboradores, (1995). A frequência foi determinada identificando-se o comportamento que o animal exibiu a cada 5 segundos. Animais submetidos a uma situação de nado forçado sem a possibilidade de escape, após certo período de tempo, tendem a se manter imóveis, mantendo apenas os movimentos necessários para manter a cabeça fora d'água. Esse comportamento é chamado de imobilidade. Nós optamos por medir tanto o tempo quanto a frequência de imobilidade, porque embora a maioria dos trabalhos publicados descrevam o tempo, mais recentemente muitos pesquisadores tem quantificado a frequência. A diminuição do tempo de imobilidade quando o animal recebe algum tratamento farmacológico indica que a droga apresenta um efeito tipo antidepressivo (PORSOLT et al., 1978). Já o comportamento de escalada consiste em fortes movimentos na vertical direcionados contra a parede do tanque e a ausência de

outros comportamentos, enquanto a natação consiste em o animal fazer movimentos horizontais ao redor do cilindro e a ausência dos outros comportamentos (POSSAMAI et al., 2014). O aumento da frequência de natação é observada em animais que receberam drogas que inibem seletivamente a recaptação de serotonina e o aumento da escalada é induzida por drogas que inibem seletivamente a recaptação de noradrenalina (DETKE et al, 1995).

3.3.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é um labirinto de madeira, formado por dois Braços Fechados (BFs), circundados por paredes de 40 cm de altura, e dois Braços Abertos (BAs), unidos perpendicularmente e elevados 50 cm do solo. Os braços abertos têm uma borda transparente de 1 cm de altura, que evita a queda do animal. Durante o teste, com duração de 5 minutos, o animal pode explorar o aparelho livremente e seu comportamento foi registrado por uma câmera de vídeo acoplada a um microcomputador. Posteriormente, foi quantificado o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e braços fechados. O modelo foi validado comportamental e farmacologicamente, observando-se sua utilidade para detectar efeitos ansiolítico e ansiogênico (PELLOW et al., 1985).

3.3.3 Campo aberto (CA)

O aparelho usado consiste em uma caixa quadrada de madeira com piso preto de 1 m² de área, sendo delimitado por 4 paredes de 30 cm de altura que impedem a fuga do animal. Neste teste, o animal foi posicionado na região central do aparelho e pode explorá-lo livremente por 5 minutos (SILOTE et al., 2013). O seu comportamento foi gravado por meio de uma webcam conectada a um microcomputador. Posteriormente, com auxílio do software ANY-maze™ (versão 4.98 para Windows, Stoelting Company, Wood Dale, IL, EUA), foi medida a distância total percorrida (em metros) pelo animal. O campo aberto, além de mensurar o comportamento locomotor e exploratório desses animais, também evidencia possível nível de ansiedade. Animais com níveis elevado de ansiedade têm grande preferência pela periferia do campo aberto (PRUT; BELZUNG, 2003).

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS

No TNF, os mesmos grupos de animais foram avaliados 2 horas e 7 dias após a administração do anestésico. O intervalo de 2 horas foi escolhido em função de estudo piloto em nosso laboratório, no qual observamos que esse tempo é suficiente para a completa recuperação da anestesia para todos os anestésicos a serem testados. O intervalo de 7 dias foi definido em função do período normalmente utilizado entre a cirurgia e os testes comportamentais para garantir a recuperação adequada dos animais. De acordo com Mezdri et al., (2011), a utilização dos mesmos grupos de animais na repetição do TNF é aceitável, uma vez que detecta efeito a curto e a longo prazo de drogas antidepressivas, podendo assim ser reduzido o número de animais para este teste. A imipramina foi utilizada como controle positivo no TNF. Com o objetivo de reduzir o número de animais a ser empregado em cada experimento, um pequeno número de animais tratados com imipramina foi empregado em cada experimento. Para a análise dos dados, esses animais tratados com imipramina foram agrupados e utilizados como controle positivo de todos os experimentos no TNF.

Já para a avaliação no LCE, foram utilizados grupos independentes de animais. Um deles foi testado 2 horas após a administração do anestésico e o outro foi testado 7 dias após a administração. File & Zangrossi (1993) mostraram que a exposição repetida a esse teste gera no animal um estado de ansiedade próximo a um estado de fobia, que não é responsivo a drogas ansiolíticas. Por outro lado, os mesmos animais submetidos ao LCE foram testados no campo aberto. O diazepam foi utilizado como controle positivo para esse teste. Com o objetivo de reduzir o número de animais a ser empregado em cada experimento, um pequeno número de animais tratados com diazepam foi empregado em cada experimento. Para a análise dos dados, esses animais tratados com diazepam foram agrupados e utilizados como controle positivo de todos os experimentos com o LCE.

Ao final da primeira etapa de experimentos, os anestésicos que na dose anestésica não afetaram o comportamento dos animais no TNF ou LCE 7 dias após a administração foram selecionados para um segundo experimento. Nesse, o anestésico foi administrado e 7 dias depois os animais foram tratados com

imipramina (15mg/kg) ou diazepam (2,5mg/kg) e testados 1 hora depois, respectivamente, no TNF ou no LCE.

- Experimento 1:

1a – Efeito do tribromoetanol, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos submetidos ao TNF 2h ou 7 dias após a administração de uma única dose do anestésico. A imipramina foi administrada 24 horas 5 horas e 1 hora antes do teste (adaptado PORSOLT et al., 1978). Foram 5 grupos experimentais: imipramina 15mg/kg (n=11); tribromoetanol 40mg/kg (n=8); tribromoetanol 90mg/kg (n=9); tribromoetanol 250mg/kg (n=9); salina (n=9);

1b - Efeito do tribromoetanol, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA **2h** após a administração de tribromoetanol. O diazepam foi administrado 1 hora antes do teste de acordo com estudos prévios em nosso laboratório. Foram 5 grupos experimentais: diazepam 2,5mg/kg (n=9); tribromoetanol 40mg/kg (n=9); tribromoetanol 90mg/kg (n=10); tribromoetanol 250mg/kg (n=9); salina (n=15);

1c - Efeito do tribromoetanol, administrado por via i.p, sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA **7 dias** após a administração de tribromoetanol. O diazepam foi administrado 1 h antes do teste. Foram 5 grupos experimentais: diazepam 2,5mg/kg (n=6); tribromoetanol 40mg/kg (n=8); tribromoetanol 90mg/kg (n=8); tribromoetanol 250mg/kg (n=8); salina (n=10).

- Experimento 2:

2a – Efeito do hidrato de cloral, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos submetidos ao TNF 2h ou 7 dias após a administração de uma única dose do anestésico. Foram 4 grupos experimentais: hidrato de cloral 50mg/kg (n=10); hidrato de cloral 150mg/kg (n=12); hidrato de cloral 400mg/kg (n=9); salina (n=15).

2b - Efeito do hidrato de cloral, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA **2h** após a administração de hidrato de cloral. Foram 4 grupos experimentais: hidrato de cloral 50mg/kg (n=10); hidrato de cloral 150mg/kg (n=11); hidrato de cloral 400mg/kg (n=7); salina (n=9).

2c - Efeito do hidrato de cloral, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA **7 dias** após a administração de hidrato de cloral. Foram 4 grupos experimentais: hidrato de cloral 50mg/kg (n=8); hidrato de cloral 150mg/kg (n=6); hidrato de cloral 400mg/kg (n=5); salina (n=7).

- Experimento 3:

Efeito antidepressivo da imipramina (15mg/kg) no TNF em ratos tratados previamente (7 dias antes) com tribromoetanol 250mg/mg ou com hidrato de cloral 400mg/kg. A imipramina ou salina foram administradas de acordo com o experimento 1a. Foram 6 grupos experimentais: salina+salina (n=8); salina+imipramina (n=5); tribromoetanol+salina (n=8); hidrato de cloral+salina (n=6); tribromoetanol+imipramina; (n=6); hidrato de cloral+imipramina (n=7). Os grupos salina+salina e salina+imipramina foram os mesmos para os testes com tribromoetanol e com hidrato de cloral.

- Experimento 4:

4a – Efeito do tiopental, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos submetidos ao TNF 2h ou 7 dias após a administração de uma única dose do anestésico. Foram 4 grupos experimentais: tiopental 5mg/kg (n=7); tiopental 15mg/kg (n=7); tiopental 40mg/kg (n=7); salina (n=8);

4b - Efeito do tiopental, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA **2h** após a administração de tiopental. Foram 4 grupos experimentais: tiopental 5mg/kg (n=9); tiopental 15mg/kg (n=11); tiopental 40mg/kg (n=8); salina (n=10);

4c - Efeito do tiopental, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA **7 dias** após a administração de tiopental. Foram 4 grupos experimentais: tiopental 5mg/kg (n=8); tiopental 15mg/kg (n=8); tiopental 40mg/kg (n=8); salina (n=8).

- Experimento 5:

Efeito ansiolítico do diazepam (2,5mg/kg) no LCE em ratos tratados previamente (7 dias antes) com tiopental 40mg/mg. O diazepam ou salina foram administrados 1 h antes do teste. Foram 4 grupos experimentais: salina+salina (n=9); salina+diazepam (n=8); tiopental+salina (n=8); tiopental+diazepam (n=11).

- Experimento 6:

6a – Efeito do isoflurano, administrado por via inalatória, sobre o comportamento de ratos submetidos ao TNF 2h ou 7 dias após a administração de uma única dose do anestésico. O isoflurano foi administrado por 20 minutos, que é o tempo médio necessário para execução de uma cirurgia estereotóxica simples. Foram 4 grupos experimentais: isoflurano 0,5% (n=7); isoflurano 1,5% (n=7); isoflurano 4% (n=7); ar (n=7). O isoflurano na concentração de 4% foi aplicado para indução da anestesia (cerca de 5 min), confirmada pela perda do reflexo palpebral e do tônus muscular. Durante os 15 minutos restantes, a anestesia foi mantida com a concentração de 2% de isoflurano.

6b - Efeito do isoflurano, administrado por via inalatória, sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA **2h** após a administração de isoflurano. O isoflurano foi administrado de acordo com o experimento 6a. Foram 4 grupos experimentais: isoflurano 0,5% (n=7); isoflurano 1,5% (n=7); isoflurano 4% (mantido a 2% após indução, n=7); ar (n=7);

6c - Efeito do isoflurano, administrada por via inalatória, sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA **7 dias** após a administração de isoflurano. O isoflurano foi administrado de acordo com o experimento 6a. Foram 4 grupos experimentais: isoflurano 0,5% (n=6); isoflurano 1,5% (n=7); isoflurano 4% (mantido a 2% após indução, n=7); ar (n=7).

- Experimento 7:

7a – Efeito antidepressivo da imipramina (15mg/kg) no TNF em ratos tratados previamente (7 dias antes) com isoflurano 4% (mantido a 2% após indução). A administração da imipramina foi de acordo com o experimento 1a e a administração do isoflurano de acordo com o experimento 6a. Foram 4 grupos experimentais: ar+salina (n=8); ar+imipramina (n=8); isoflurano+salina (n=8); isoflurano+imipramina (n=6).

7b – Efeito ansiolítico do diazepam (2,5mg/kg) no LCE em ratos tratados previamente (7 dias antes) com isoflurano 4% (mantido a 2% após indução). A administração do diazepam foi de acordo com o experimento 1b e a administração do isoflurano de acordo com o experimento 6a. Foram 4 grupos

experimentais: ar+salina (n=8); ar+diazepam (n=8); isoflurano+salina (n=8); isoflurano+diazepam (n=8).

O esquema com o procedimento experimental pode ser visto nas figuras 5 e 6.

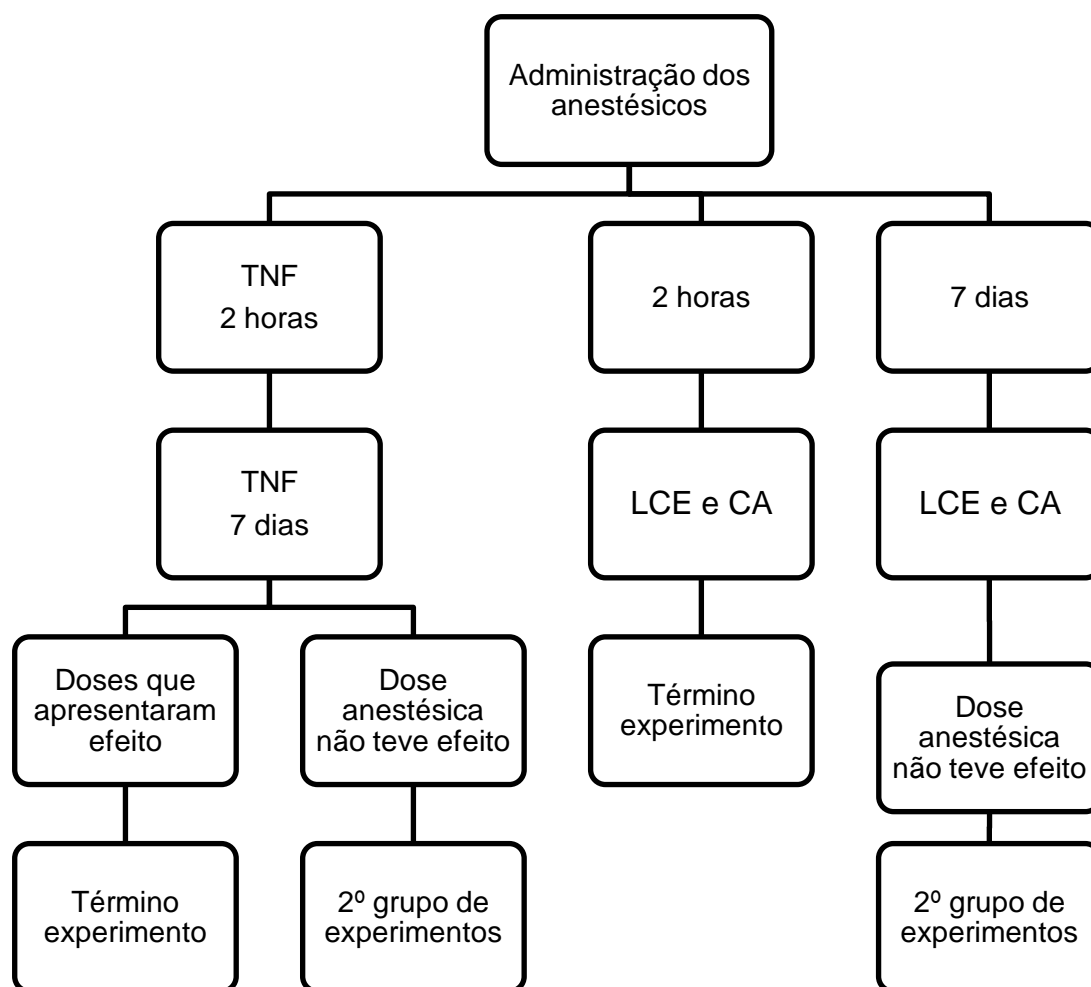


Figura 5 – Procedimento experimental do primeiro grupo de experimentos

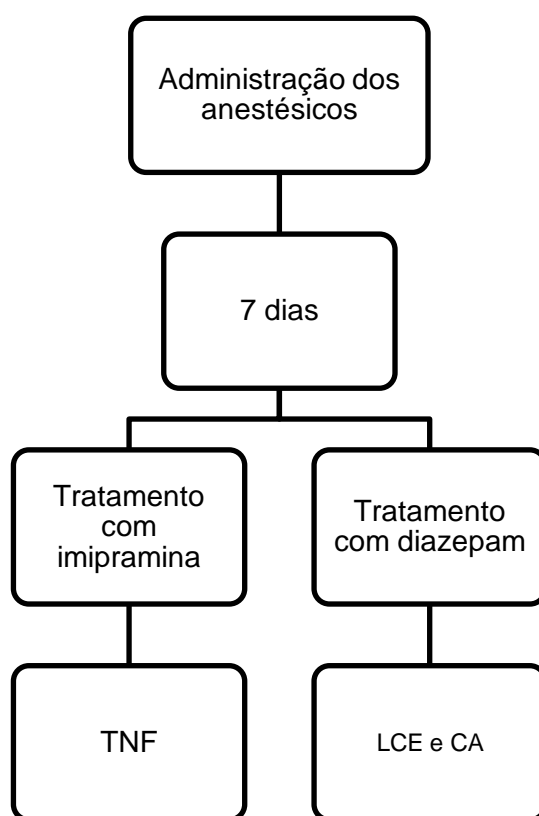


Figura 6 – Procedimento experimental do segundo grupo de experimentos

3.5 ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM), analisados com o programa de estatística SPSS para Windows® (Versão 20.0) e os gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism (versão 5.01). O tempo de imobilidade no TNF para os anestésicos testados isoladamente foi analisado por análise de variância (ANOVA) de 2 vias com medida repetida, tendo como fator independente o tratamento e como medidas repetidas os comportamentos mensurados em cada sessão (2h e 7 dias). Nos casos em que houve efeito estatisticamente significativo do tratamento ou interação entre o tratamento e a sessão, foi realizado teste *post hoc* de Duncan. As medidas do LCE e do CA para os anestésicos testados isoladamente foram analisadas por ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan quando apropriado para comparações entre os grupos. Para os experimentos que avaliaram o efeito da imipramina ou do diazepam em animais previamente anestesiados foi utilizada a ANOVA de duas vias com uma única variável, sendo os fatores independentes o tratamento com

imipramina ou diazepam e o tratamento com o anestésico. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Experimento 1a – Efeito do tribromoetanol, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos submetidos ao TNF 2h e 7 dias após a administração do anestésico.

A análise do tempo de imobilidade no TNF através da ANOVA de 2 vias com medida repetida mostrou que houve efeito da sessão [$F_{(1,31)}=14,517;p<0,001$], mas não houve efeito do tratamento [$F_{(3,31)}=0,959;p=0,425$] e não houve interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,31)}=2,008;p=0,133$]. Já para a frequência de escalada houve o efeito da sessão [$F_{(1,26)}=10,067;p<0,004$], não houve efeito do tratamento [$F_{(3,26)}=1,553;p=0,225$] e tampouco interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,326)}=1,052;p=0,386$]. Para a frequência de natação, não houve efeito da sessão [$F_{(1,26)}=0,016;p=0,900$], do tratamento [$F_{(3,26)}=0,148;p=0,930$] e não houve interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,26)}=1,483;p=0,242$]. Em relação à frequência de imobilidade, não ocorreu efeito da sessão [$F_{(1,26)}=2,276;p=0,114$], do tratamento [$F_{(1,26)}=1,381;p=0,271$] e não houve interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,26)}=0,300;p=0,825$]. Dessa forma, nenhuma das doses do tribromoetanol (40mg/kg, 90mg/kg e 250mg/kg) alterou o tempo de imobilidade ou as frequências de escalada, natação e imobilidade 2 horas (Figuras 7A e 7B) ou 7 dias (Figuras 7C e 7D) após a administração do anestésico. Como esperado, o controle positivo imipramina reduziu o tempo de imobilidade [$t=3,825;p<0,001$], reduziu a frequência de imobilidade [$t=4,637;p<0,001$], aumentou a frequência de escalada [$t=3,595;p=0,003$] e não afetou a frequência de natação [$t=0,942;p=0,362$] e 2 horas após a sua administração quando comparado ao grupo salina (Figuras 7A e 7B).

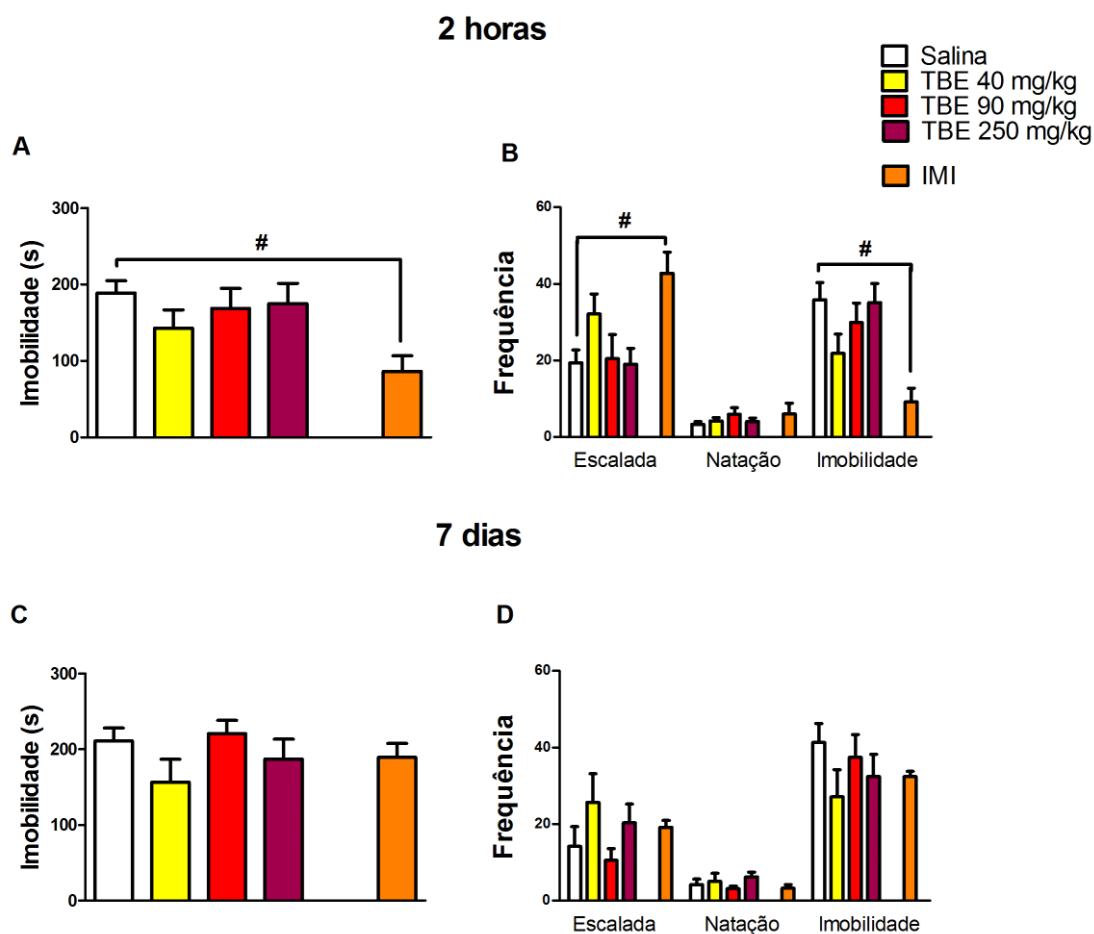


Figura 7 – Comportamento de ratos tratados com uma única injeção intraperitoneal de salina (n=9), tribromoetanol (TBE 40mg/kg, n=8; TBE 90mg/kg, n=9 e TBE 250mg/kg, n=9) ou imipramina 15mg/kg (IMI, n=11) submetidos ao teste do nado forçado 2 horas ou 7 dias após a administração do anestésico. (A e C) Tempo de imobilidade (em segundos) e (B e D) frequência de escalada, natação e imobilidade. # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina (teste t de Student).

Experimento 1b - Efeito do tribromoetanol, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA 2h após a administração de tribromoetanol.

Os resultados do tribromoetanol no LCE são mostrados na figura 8. Duas horas após a administração, o tribromoetanol na dose de 90mg/kg mostrou uma tendência a aumentar a porcentagem de entradas [$F_{(3,39)}=2,610; p=0,065$; Duncan, $p < 0,05$] e aumentou a porcentagem de tempo [$F_{(3,39)}=2,884; p=0,048$] nos BAs. Não houve alteração no número de entradas nos BFs [$F_{(3,39)}=0,182; p=0,908$]. O diazepam também aumentou a porcentagem de entradas [$t=2,833; p=0,010$] e de tempo [$t=3,873; p=0,001$] nos BAs e o número de entradas nos BFs [$t=2,408; p=0,025$].

Experimento 1c - Efeito do tribromoetanol, administrado por via i.p, sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA 7 dias após a administração de tribromoetanol

Sete dias após a aplicação das drogas, a dose anestésica de tribromoetanol (250mg/kg) reduziu a porcentagem de entradas nos BAs quando comparado ao grupo controle [$F_{(3,28)}=3,165;p=0,040$;Duncan, $p<0,05$], não houve diferença na porcentagem de tempo nos BAs [$F_{(3,28)}=1,533;p=0,228$], enquanto o tribromoetanol de 90mg/kg não alterou as entradas nos BFs [$F_{(3,28)}=2,268;p=0,102$]. O diazepam não alterou as entradas nos BAs [$t=0,451;p=0,659$] ou o tempo nos BAs [$t=0,193;p=0,850$], e também não mostrou efeito nos BFs [$t=1,451;p=0,169$] sete dias após a sua aplicação (figura 8).

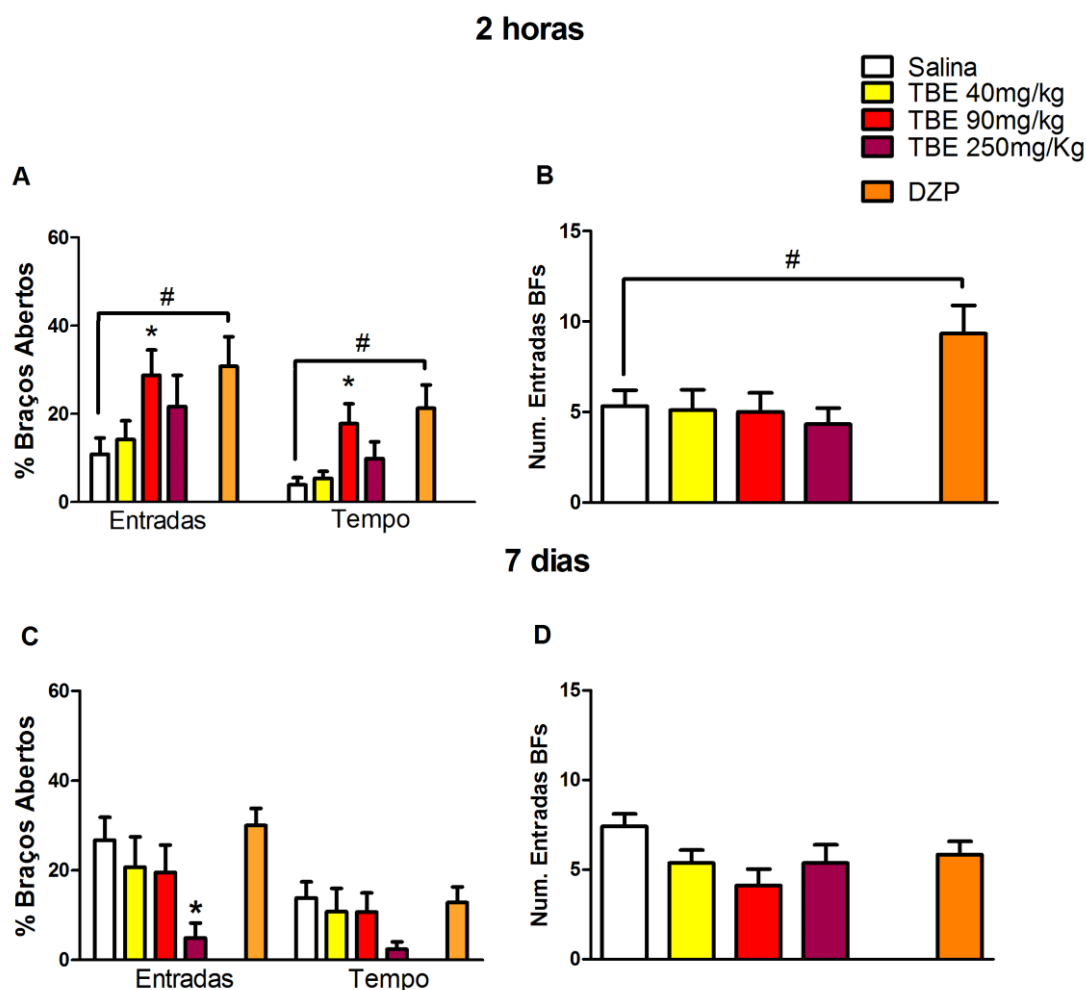


Figura 8 – Comportamento de ratos tratados com tribromoetanol (TBE) e expostos ao LCE. (A) Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e (B) número de entradas nos braços fechados (BFs) 2 horas após o tratamento com salina (n=15); tribromoetanol (TBE 40mg/kg, n=9; TBE 90mg/kg, n=10 e TBE 250mg/kg, n=9) ou diazepam 2,5mg/kg (DZP, n=9). (C) Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e (D) número de entradas nos braços fechados (BFs) 7 dias após o tratamento com salina (n=8); diazepam 2,5mg/kg (n=6) ou tribromoetanol (TBE 40mg/kg, n=8; TBE 90mg/kg, n=8 e TBE 250mg/kg, n=8). *p<0,05 comparado com o grupo salina (ANOVA seguida de Duncan). #p<0,05 comparado com o grupo salina (teste t de Student).

Experimento 2a – Efeito do hidrato de cloral, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos submetidos ao TNF 2h e 7 dias após a administração de uma única dose do anestésico

A ANOVA de 2 vias com medidas repetidas para o hidrato de cloral no TNF não mostrou efeito na sessão [$F_{(1,42)}=0,832$; $p=0,367$], não mostrou interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,42)}=0,085$; $p=0,968$], mas foi observado o efeito do tratamento [$F_{(3,42)}=3,009$; $p=0,041$]. Apenas a dose de 150mg/kg desse anestésico reduziu de forma aguda o tempo de imobilidade quando comparado

com o grupo salina (Duncan, $p < 0,05$; Fig. 9A e 9B). Para a escalada, não houve efeito da sessão [$F_{(1,42)} = 0,530$; $p = 0,471$], do tratamento [$F_{(3,42)} = 1,755$; $p = 0,170$] e não houve interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,42)} = 0,070$; $p = 0,975$]. Também não houve efeitos significantes para a frequência de natação em relação a sessão [$F_{(1,42)} = 0,336$; $p = 0,565$], tratamento [$F_{(3,42)} = 0,623$; $p = 0,604$] e interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,42)} = 0,884$; $p = 0,457$]. Na frequência de imobilidade não houve efeito da sessão [$F_{(1,42)} = 0,849$; $p = 0,362$], não foi observada interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,42)} = 0,143$; $p = 0,933$]. Entretanto, houve uma tendência ao efeito do tratamento [$F_{(3,42)} = 2,558$; $p = 0,068$] (figura 9).

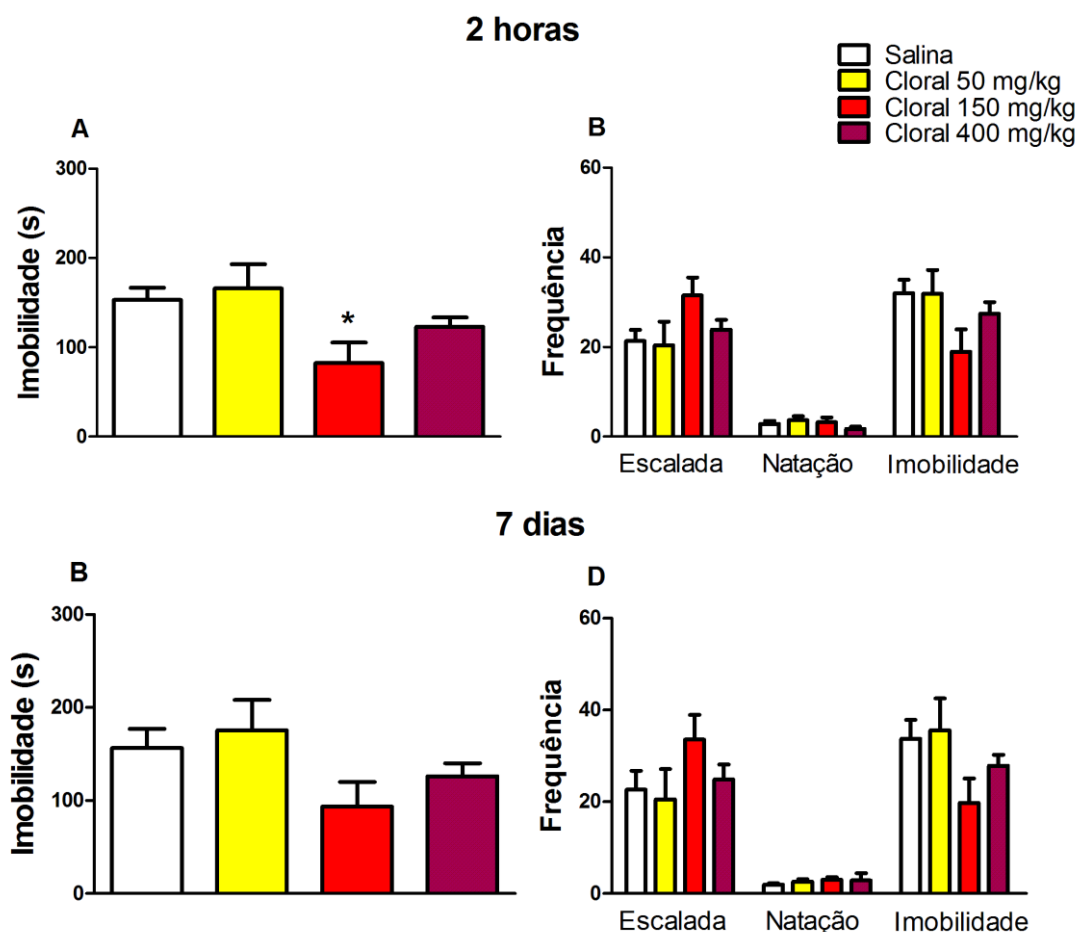


Figura 9 – Comportamento de ratos tratados com uma única injeção intraperitoneal de salina ($n=15$) ou hidrato de cloral (cloral 50mg/kg, $n=10$; cloral 150mg/kg, $n=12$ e cloral 400mg/kg, $n=9$) submetidos ao teste do nado forçado 2 horas ou 7 dias após a administração do anestésico. (A e C) Tempo de imobilidade (em segundos) e (B e D) frequência de escalada, natação e imobilidade. * $p < 0,05$ comparado com o grupo salina (ANOVA seguida de Duncan).

Experimento 2b - Efeito do hidrato de cloral, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA 2h após a administração de hidrato de cloral.

A figura 10 representa os dados do hidrato de cloral no LCE. Somente o hidrato de cloral na dose anestésica (400mg/kg) aumentou a porcentagem de entradas nos BAs [$F_{(3,33)}=3,723$; $p=0,021$], não houve efeito no tempo demorado nos BAs [$F_{(3,33)}=0,934$; $p=0,435$] e nas entradas nos BFs [$F_{(3,33)}=1,750$; $p=0,176$].

Experimento 2c - Efeito do hidrato de cloral, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA 7 dias após a administração de hidrato de cloral.

No teste sete dias após o tratamento, o hidrato de cloral 400mg/kg aumentou tanto a porcentagem de entradas nos BAs [$F_{(3,22)}=4,213$; $p=0,017$] quanto de tempo nos BAs [$F_{(3,22)}=6,467$; $p=0,003$] e não houve efeito nos BFs [$F_{(3,22)}=2,059$; $p=0,135$] (figura 10).

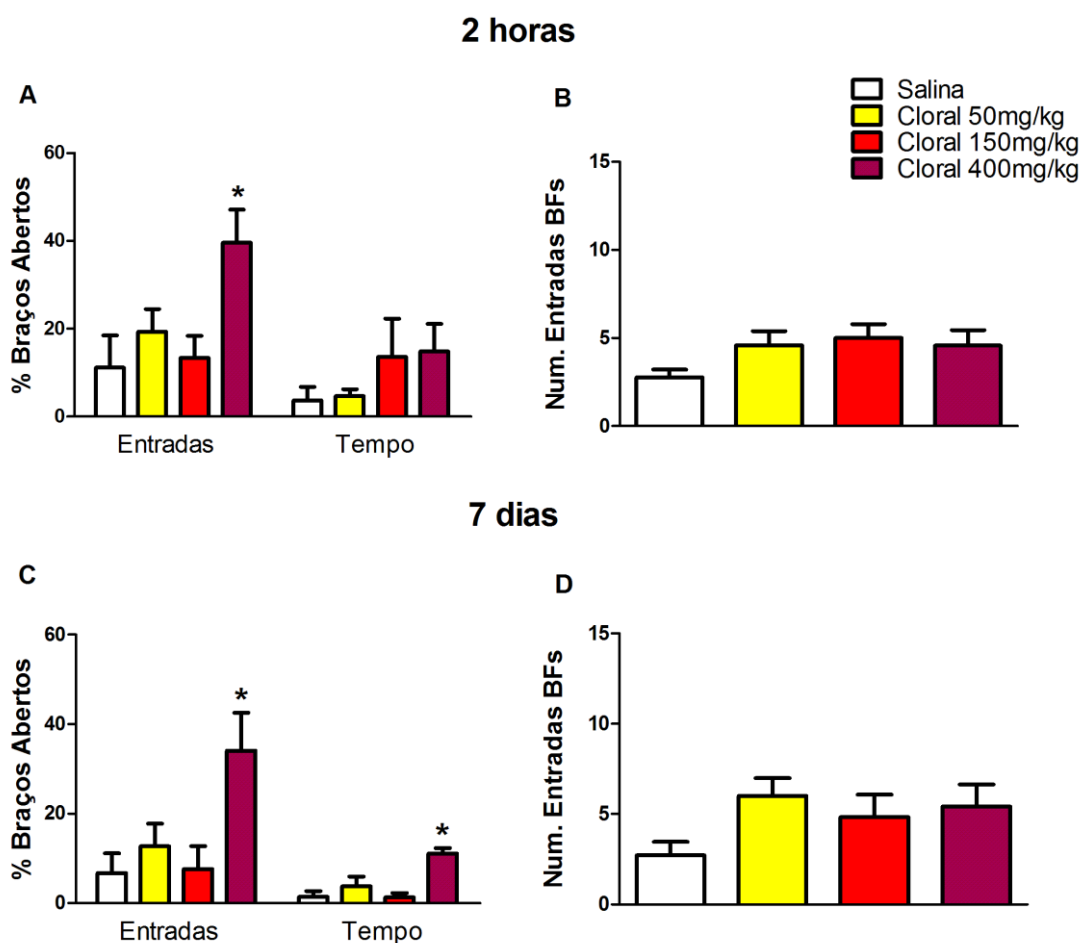


Figura 10 – Comportamento de ratos tratados com hidrato de cloral (Cloral) e expostos ao LCE. (A) Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e (B) número de entradas nos braços fechados (BFs) 2 horas após o tratamento com salina (n=9); hidrato de cloral (Cloral 50mg/kg, n=10; Cloral 150mg/kg, n=11 e Cloral 400mg/kg (n=7). (C) Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e (D) número de entradas nos braços fechados (BFs) 7 dias após o tratamento com salina (n=7); hidrato de cloral (Cloral 50mg/kg, n=8; Cloral 150mg/kg, n=6 e Cloral 400mg/kg, n=5). *p<0,05 comparado com o grupo salina (ANOVA seguida de Duncan).

Experimento 3 - Efeito antidepressivo da imipramina (15mg/kg) no TNF em ratos tratados previamente (7 dias antes) com tribromoetanol 250mg/mg ou hidrato de cloral 400mg/kg

No tempo de imobilidade não foi observado efeito do tratamento com tribromoetanol [$F_{(1,23)}=1,347$; $p=0,258$], porém foi observado efeito do tratamento com imipramina [$F_{(1,23)}=19,017$; $p<0,001$] e não houve interação entre o tratamento com tribromoetanol e com imipramina [$F_{(1,23)}=0,176$; $p=0,678$]. Também houve efeito da imipramina na frequência de escalada [$F_{(1,23)}=35,373$; $p<0,001$], não houve efeito do tribromoetanol [$F_{(1,23)}=1,230$; $p=0,279$] e nem interação entre a imipramina e o anestésico [$F_{(1,23)}=0,135$; $p=0,716$]. Não foi

observado efeito do tribromoetanol na natação [$F_{(1,23)}=0,502$; $p=0,486$], nem da imipramina [$F_{(1,23)}=0,825$; $p=0,373$] e também não houve interação entre o tratamento com tribromoetanol e imipramina [$F_{(1,23)}=0,622$; $p=0,439$]. Houve efeito do tratamento com imipramina na frequência de imobilidade [$F_{(1,23)}=37,462$; $p<0,001$], não houve do tribromoetanol [$F_{(1,23)}=0,971$; $p=0,335$] e nem interação entre o tratamento com tribromoetanol e com imipramina [$F_{(1,23)}=0,395$; $p=0,536$].

Já a análise do tempo de imobilidade dos animais tratados com imipramina 7 dias após a administração do hidrato de cloral não mostrou efeito para o tempo de imobilidade com o hidrato de cloral [$F_{(1,22)}=0,918$; $p=0,348$], mas mostrou o efeito da imipramina [$F_{(1,22)}=29,178$; $p<0,001$] e não houve interação entre o hidrato de cloral e imipramina [$F_{(1,22)}=1,097$; $p=0,306$]. Na frequência de escalada, foi observado o efeito da imipramina [$F_{(1,22)}=42,628$; $p<0,001$] mas não do hidrato de cloral [$F_{(1,22)}=0,328$; $p=0,573$] ou interação entre o anestésico e a imipramina [$F_{(1,22)}=0,354$; $p=0,558$]. O tratamento com hidrato de cloral não afetou a natação [$F_{(1,22)}=0,022$; $p=0,883$], o tratamento com imipramina também não afetou esse comportamento [$F_{(1,22)}=0,047$; $p=0,830$] e não houve interação entre o tratamento com hidrato de cloral e imipramina [$F_{(1,22)}=0,103$; $p=0,752$]. Na frequência de imobilidade também foi observado o efeito da imipramina [$F_{(1,22)}=45,175$; $p<0,001$], não houve efeito do anestésico [$F_{(1,22)}=0,480$; $p=0,496$], nem interação entre o hidrato de cloral e imipramina [$F_{(1,22)}=0,034$; $p=0,856$].

Para os animais tratados com imipramina 7 dias após a administração de tiopental não houve efeito para o tempo de imobilidade no grupo que recebeu tiopental [$F_{(1,24)}=1,697$; $p=0,205$], houve efeito com a imipramina [$F_{(1,24)}=46,463$; $p<0,001$] mas não houve interação entre o tiopental e a imipramina [$F_{(1,24)}=1,743$; $p=0,199$]. Na frequência de escalada não houve efeito do tiopental [$F_{(1,24)}=0,827$; $p=0,372$], houve da imipramina [$F_{(1,24)}=77,547$; $p<0,001$] e não houve interação entre tiopental e imipramina [$F_{(1,24)}=0,620$; $p=0,439$]. Na frequência de natação não houve efeito do tiopental [$F_{(1,24)}=2,770$; $p=0,109$], imipramina [$F_{(1,24)}=0,212$; $p=0,649$] ou interação entre tiopental e imipramina [$F_{(1,24)}=0,362$; $p=0,553$]. Já na frequência de imobilidade não houve efeito do tiopental [$F_{(1,24)}=0,334$; $p=0,569$], houve da imipramina

[$F_{(1,24)}=73,748$; $p<0,001$] e não houve interação entre o tratamento com tiopental ou imipramina [$F_{(1,24)}=0,072$; $p=0,791$].

Os grupos salina+salina e salina+imipramina foram os mesmos para os grupos que receberam tribromoetanol, hidrato de cloral ou tiopental (figura 11).

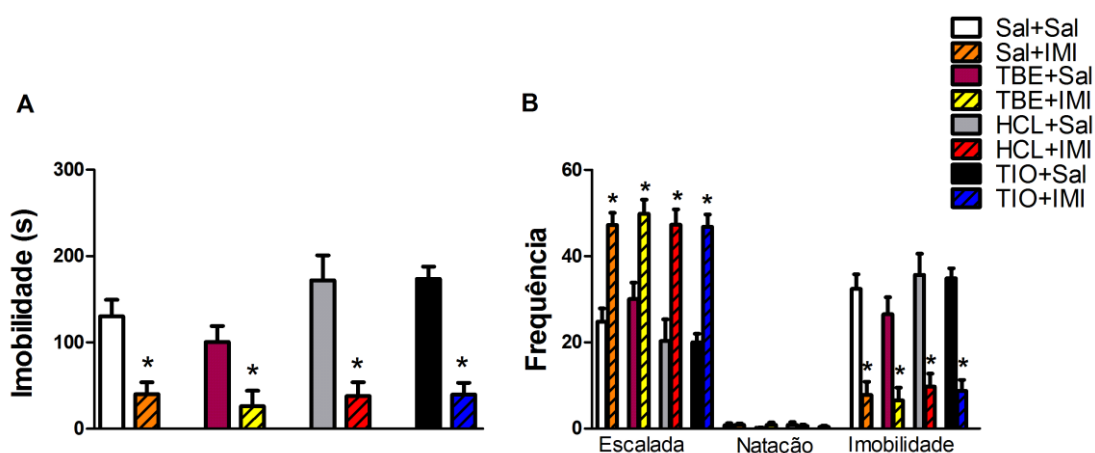


Figura 11– Efeito da imipramina em ratos tratados com tribromoetanol, hidrato de cloral ou tiopental 7 dias antes do teste do nado forçado. (A) Tempo de imobilidade (em segundos) e (B) frequência de escalada, de natação e de imobilidade. Os grupos experimentais foram salina-salina (Sal+Sal, n=8); salina+imipramina 15mg/kg (Sal+IMI, n=5); tribromoetano 250mg/kg+salina (TBE+Sal, n=8); tribromoetanol+imipramina 15mg/kg (TBE+IMI, n=6), hidrato de cloral 400mg/kg+salina (HCL+Sal, n=6), hidrato de cloral 400mg/kg+imipramina 15mg/kg (HCL+IMI, n=7) tiopental 40mg/kg+salina (TIO+sal) e tiopental 40mg/kg+imipramina 15mg/kg (TIO+sal). * $p<0,05$ comparado com o grupo salina (ANOVA seguida de Duncan).

4a – Efeito do tiopental, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos submetidos ao TNF 2h e 7 dias após a administração de uma única dose do anestésico

A ANOVA de medidas repetidas para o tempo de imobilidade dos animais tratados com o tiopental não mostrou efeito da sessão [$F_{(1,25)}=0,228$; $p=0,637$], mostrou uma tendência ao tratamento [$F_{(3,25)}=2,748$; $p=0,064$], e mostrou interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,25)}=4,807$; $p=0,009$]. O tiopental, na dose de 40mg/kg, diminuiu o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle (Duncan $p<0,05$) somente 2 horas após a aplicação em relação a salina (Fig. 12A e 12B). Na análise da frequência de escalada, houve efeito da sessão [$F_{(1,25)}=8,658$; $p=0,007$], não houve efeito do tratamento [$F_{(3,25)}=0,608$; $p=0,616$] e não houve interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,25)}=1,078$; $p=0,376$]. Na frequência de natação foi observado um efeito da sessão

[$F_{(1,25)}=11,988$; $p=0,002$], efeito do tratamento [$F_{(3,25)}=8,143$; $p=0,001$] e houve interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,25)}=7,818$; $p=0,001$]. A dose de 40mg/kg de tiopental aumentou a frequência de natação comparado ao grupo salina (Duncan, $p<0,05$) somente 2 horas após a aplicação em relação a salina. Não houve efeito da sessão para a frequência de imobilidade [$F_{(1,25)}=1,057$; $p=0,314$], do tratamento [$F_{(3,25)}=2,086$; $p=0,128$], porém houve interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,25)}=5,715$; $p=0,004$]. A dose anestésica de tiopental reduziu a frequência de imobilidade somente 2 horas após a aplicação em relação a salina (Duncan, $p<0,05$). As demais doses do tiopental não mostraram efeito no TNF.

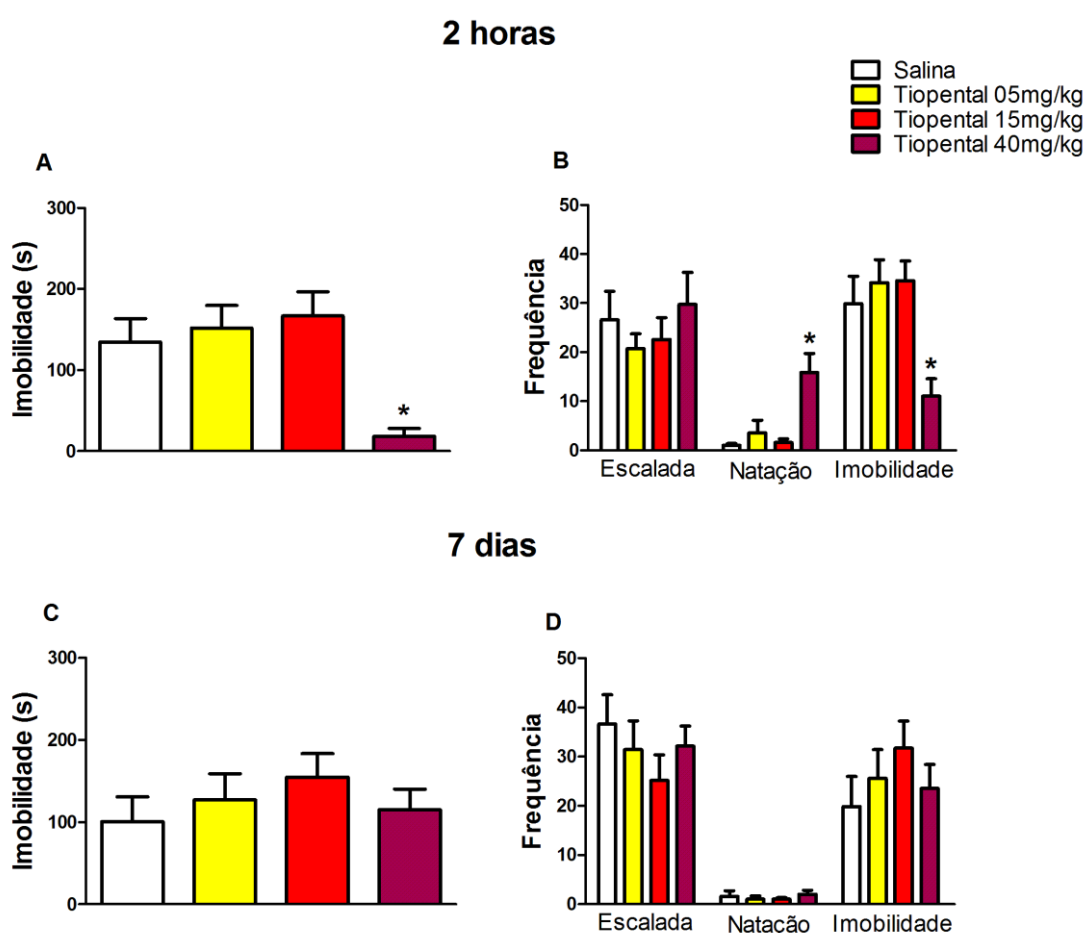


Figura 12 – Comportamento de ratos tratados com uma única injeção intraperitoneal de salina (n=8), tiopental 5mg/kg (n=10); tiopental 15mg/kg (n=12) ou tiopental 40mg/kg (n=9) submetidos ao teste do nado forçado 2 horas ou 7 dias após a administração do anestésico. (A e C) Tempo de imobilidade (em segundos) e (B e D) frequência de escalada, natação e imobilidade 2 horas após tratamento. * $p<0,05$ comparado com o grupo salina (ANOVA seguida de Duncan).

4b - Efeito do tiopental, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA 2h após a sua administração.

O comportamento dos animais tratados com tiopental no LCE é mostrado na Figura 13. O tiopental não afetou a porcentagem de entradas nos BAs [$F_{(3,34)}=1,368;p=0,269$], e a porcentagem de tempo nos BAs [$F_{(3,34)}=0,966;p=0,420$]. Também não afetou o número entradas nos BFs [$F_{(3,34)}=0,330;p=0,803$].

4c - Efeito do tiopental, administrado por via i.p., sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA 7 dias após a sua administração.

O tiopental também não afetou a porcentagem de entradas nos BAs [$F_{(3,28)}=0,962;p=0,424$], a porcentagem de tempo nos BAs [$F_{(3,28)}=0,818;p=0,495$] e o número de entradas nos BFs [$F_{(3,28)}=0,497;p=0,687$] 7 dias após o tratamento (Fig. 13).

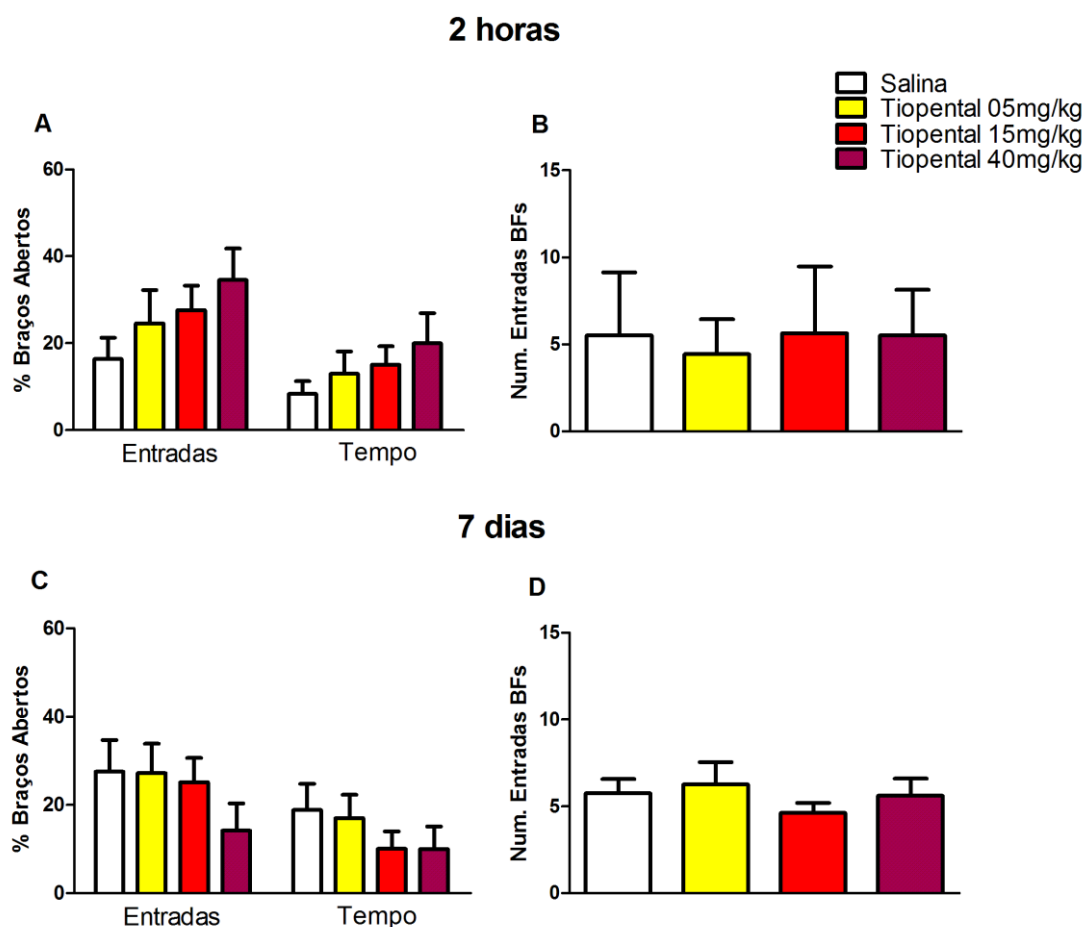


Figura 13 – Comportamento de ratos tratados com tiopental e expostos ao LCE. (A) Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e (B) número de entradas nos braços fechados (BFs) 2 horas após o tratamento com salina (n=10); tiopental 05mg/kg (n=9); tiopental 15mg/kg (n=11) e tiopental 40mg/kg (n=8). (C) Porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos e (D) número de entradas nos braços fechados (BFs) 7 dias após o tratamento com salina (n=8); tiopental 05mg/kg (n=8); tiopental 15mg/kg (n=8) e tiopental 40mg/kg, n=8). * $p < 0,05$ comparado com o grupo salina (ANOVA seguida de Duncan).

Experimento 5 - Efeito ansiolítico do diazepam (2,5mg/kg) no LCE em ratos tratados previamente (7 dias antes) com tiopental 40mg/mg

A ANOVA de 2 vias para a porcentagem de entradas nos BAs mostrou efeito do tratamento com diazepam 2,5mg/kg [$F_{(1,32)}=6,406; p=0,016$], não mostrou efeito do tratamento com tiopental 40mg/kg [$F_{(1,32)}=0,196; p=0,684$], nem interação entre o tratamento com tiopental e diazepam [$F_{(1,32)}=0,005; p=0,942$]. O diazepam também aumentou o tempo de permanência nos BAs [$F_{(1,32)}=6,918; p=0,013$], não houve efeito do anestésico [$F_{(1,32)}=0,048; p=0,664$] e tampouco interação entre tiopental e diazepam [$F_{(1,32)}=0,192; p=0,664$]. O tratamento com tiopental não afetou as entradas nos BFs [$F_{(1,32)}=0,222; p=0,641$], nem o tratamento com

diazepam $F_{(1,32)}=0,637;p=0,431$], e não houve interação entre o tratamento com tiopental e diazepam $F_{(1,32)}=0,017;p=0,898$] (Fig. 14).

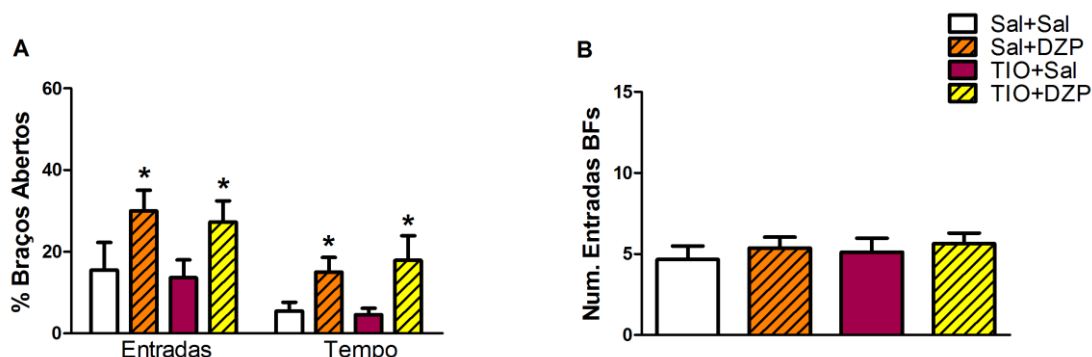


Figura 14 – Efeito ansiolítico do diazepam no LCE em ratos tratados previamente (7 dias antes) com tiopental. (A) Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e (B) número de entradas nos braços fechados (BFs) nos animais tratados com salina-salina (Sal-Sal, n=9); salina-diazepam 2,5mg/kg (Sal-DZP, n=8) tiopental 40mg/kg-salina (TIO-Sal, n=8); tiopental 40mg/kg-diazepam 2,5 mg/kg (TIO-DZP, n=11). * $p<0,05$ comparado com o grupo Sal-Sal (ANOVA de duas vias seguida de Duncan).

6a – Efeito do isoflurano, administrado por via inalatória, sobre o comportamento de ratos submetidos ao TNF 2h e 7 dias após a administração de uma única dose do anestésico.

A análise do tempo de imobilidade em animais tratados com isoflurano submetidos ao TNF mostrou efeito da sessão [$F_{(1,23)}=4,396;p=0,047$], mas não mostrou efeito do tratamento [$F_{(3,23)}=0,779; p=0,517$] e interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,23)}=0,705;p=0,558$]. Na escalada, não houve efeito da sessão [$F_{(1,23)}=2,948;p=0,099$], do tratamento [$F_{(3,23)}=1,089;p=0,374$], e não houve interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,23)}=0,731;p=0,544$]. Na frequência de natação, houve tendência ao efeito da sessão [$F_{(1,23)}=4,095;p=0,055$] e do tratamento [$F_{(3,23)}=2,688;p=0,070$] e não houve interação entre o tempo e tratamento [$F_{(3,23)}=0,736; p=0,541$]. Na frequência de imobilidade, não houve efeito da sessão [$F_{(1,23)}=3,561;p=0,072$], do tratamento [$F_{(3,23)}=0,837;p=0,487$], e interação entre a sessão e o tratamento [$F_{(3,23)}=0,418;p=0,742$] (figura 15).

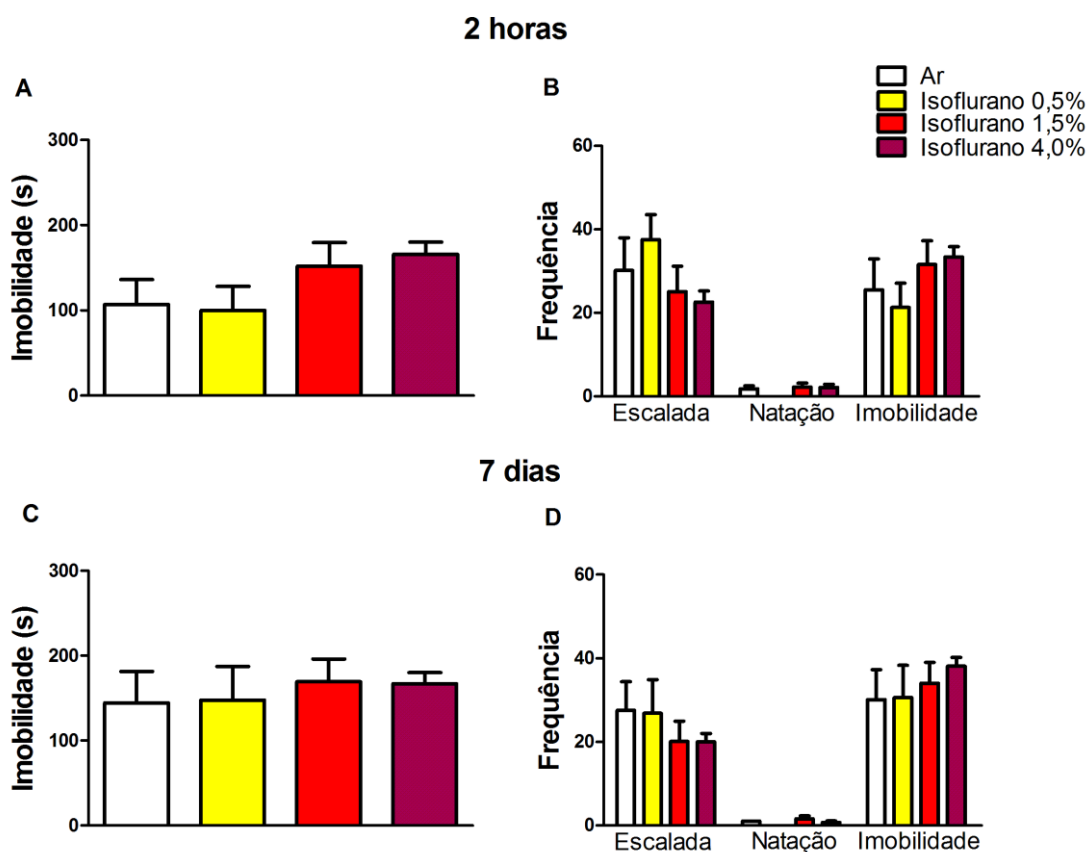


Figura 15 – Comportamento de ratos tratados com ar (n=7), isoflurano 0,5% (n=7); isoflurano 1,5% (n=7) ou isoflurano 4% (mantido a 2% após indução) (n=7) submetidos ao teste do nado forçado 2 horas ou 7 dias após a administração do anestésico. (A e C) Tempo de imobilidade (em segundos) e (B e D) frequência de escalada, natação e imobilidade 2 horas após tratamento. * $p < 0,05$ comparado com o grupo salina (ANOVA de 2 vias com medida repetida).

6b - Efeito do isoflurano, administrado por via inalatória, sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA 2h após a sua administração.

O comportamento dos animais tratados com isoflurano no LCE pode ser observado na figura 16. O isoflurano não afetou a porcentagem de entradas nos BAs [$F_{(3,24)}=0,349$; $p=0,790$], a porcentagem de tempo nos BAs [$F_{(3,24)}=0,094$; $p=0,963$], ou o número de entradas nos BFs [$F_{(3,24)}=0,977$; $p=0,420$] quando administrado 2 horas antes do teste.

6c - Efeito do isoflurano, administrado por via inalatória, sobre o comportamento de ratos no LCE e no CA 7 dias após a sua administração.

O isoflurano não afetou a porcentagem de entradas nos BAs [$F_{(3,23)}=0,775;p=0,520$], a porcentagem de tempo nos BAs [$F_{(3,23)}=0,292;p=0,831$], ou o número de entradas nos BFs [$F_{(3,23)}=1,946;p=0,150$] 7 dias após o tratamento (Fig. 16).

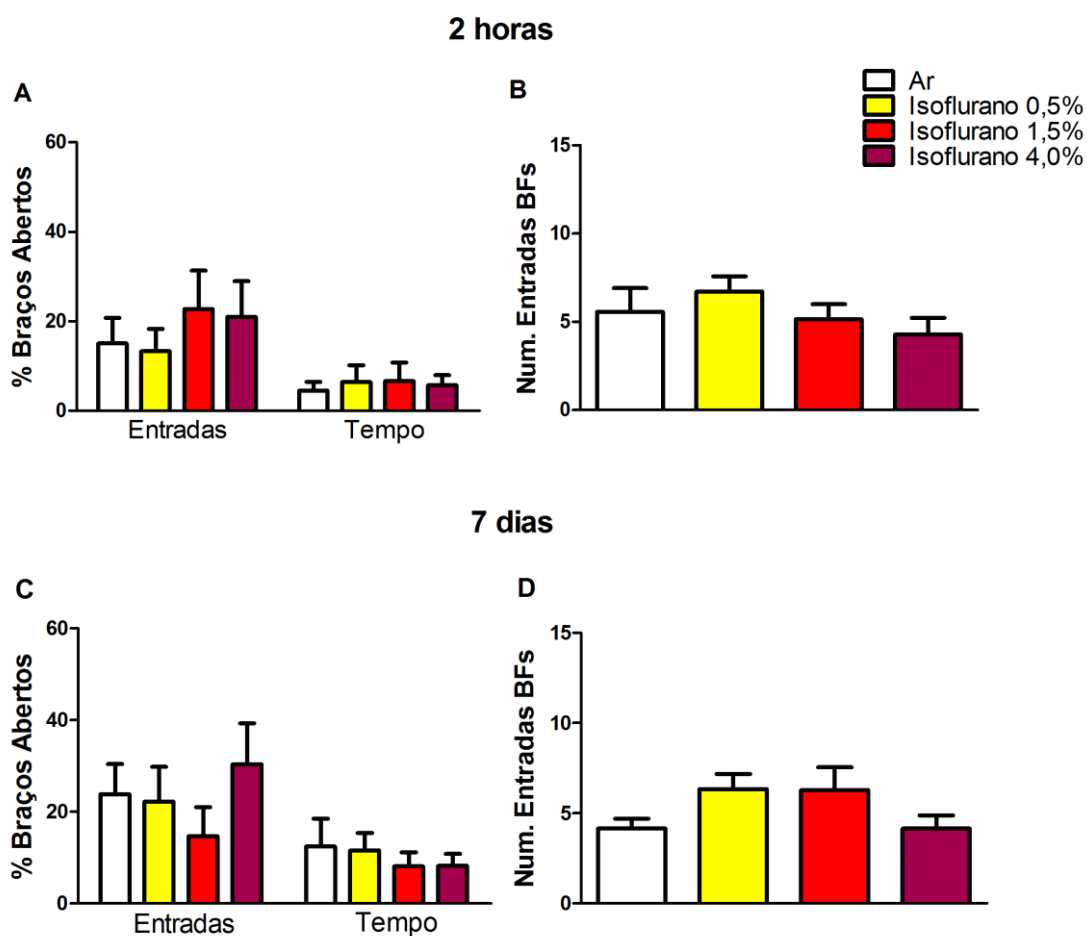


Figura 16 – Comportamento de ratos tratados com isoflurano e expostos ao LCE. (A) Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e (B) número de entradas nos braços fechados (BFs) 2 horas após o tratamento com ar (n=7); isoflurano 0,5% (n=7); isoflurano 1,5% (n=7) e isoflurano 4% (mantido a 2% após indução) (n=7). (C) Porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos e (D) número de entradas nos braços fechados (BFs) 7 dias após o tratamento com ar (n=7); isoflurano 0,5% (n=6); isoflurano 1,5 mg/kg (n=7) e isoflurano 4% (mantido a 2% após indução) (n=7). * $p<0,05$ comparado com o grupo ar (ANOVA seguida de Duncan).

7a – Efeito antidepressivo da imipramina (15mg/kg) no TNF em ratos tratados previamente (7 dias antes) com isoflurano 4% (mantido a 2% após indução).

A análise do tempo de imobilidade no TNF dos animais tratados com imipramina 7 dias após a administração de isoflurano mostrou o efeito do tratamento com imipramina [$F_{(1,27)}=45,273;p<0,001$], mas não houve efeito do tratamento com isoflurano [$F_{(1,27)}=0,970;p<0,333$] e não houve interação entre o tratamento com isoflurano e imipramina [$F_{(1,27)}=0,163;p<0,689$]. Para a frequência de escalada foi observado o efeito do tratamento com imipramina [$F_{(1,26)}=40,712;p<0,001$], não houve efeito do tratamento com isoflurano [$F_{(1,26)}=1,286;p=0,267$] e tampouco interação entre o isoflurano e a imipramina [$F_{(1,26)}=0,113;p=0,740$]. Não houve efeito na frequência de natação com a administração de isoflurano [$F_{(1,26)}=0,123;p=0,719$], de imipramina [$F_{(1,26)}=0,490;p=0,490$], ou interação entre o isoflurano ou imipramina [$F_{(1,26)}=0,123;p=0,729$]. Na frequência de imobilidade foi observado o efeito da imipramina [$F_{(1,26)}=42,964;p<0,010$], não houve efeito do isoflurano [$F_{(1,26)}=0,762;p=0,391$] e não houve interação entre o isoflurano e imipramina [$F_{(1,26)}=0,025;p=0,875$] (Fig. 17).

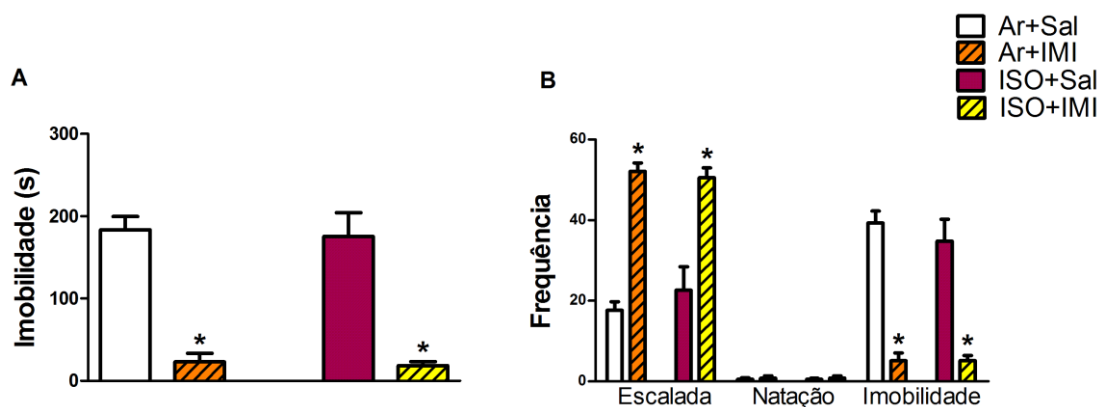


Figura 17– Efeito da Imipramina em ratos tratados com isoflurano 7 dias antes do teste do nado forçado. (A) Tempo de imobilidade (em segundos) e (B) frequência de escalada, natação e imobilidade. Os grupos experimentais foram ar-salina (Ar-Sal, n=8); ar-imipramina (Ar-IMI, n=8); isoflurano-salina (ISO-Sal, n=8); isoflurano-imipramina (ISO-IMI, n=6). * $p<0,05$ em relação ao grupo controle (Ar-Sal) (ANOVA de 2 vias seguida de Duncan).

7b – Efeito ansiolítico do diazepam (2,5mg/kg) no LCE em ratos tratados previamente (7 dias antes) com isoflurano 4% (mantidos a 2% após indução).

No LCE, a ANOVA para a porcentagem de entradas nos BAs mostrou o efeito do diazepam [$F_{(1,28)}=8,309;p=0,007$], não houve efeito do isoflurano [$F_{(1,28)}=0,176;p=0,678$] e nem interação entre o isoflurano e o diazepam [$F_{(1,28)}=1,234;p=0,276$]. A análise da porcentagem de tempo gasto nos BAs evidenciou que houve efeito do diazepam [$F_{(1,28)}=7,487;p=0,011$], não houve efeito do isoflurano [$F_{(1,28)}=0,181;p=0,674$] e também não houve interação entre o isoflurano e o diazepam [$F_{(1,28)}=1,169;p=0,289$]. As entradas nos BFs não foram afetadas pelo tratamento com isoflurano [$F_{(1,28)}=0,036;p=0,851$], com diazepam [$F_{(1,28)}=2,124;p=0,156$] e não houve interação entre isoflurano e diazepam [$F_{(1,28)}=0,197;p=0,661$] (Fig.18).

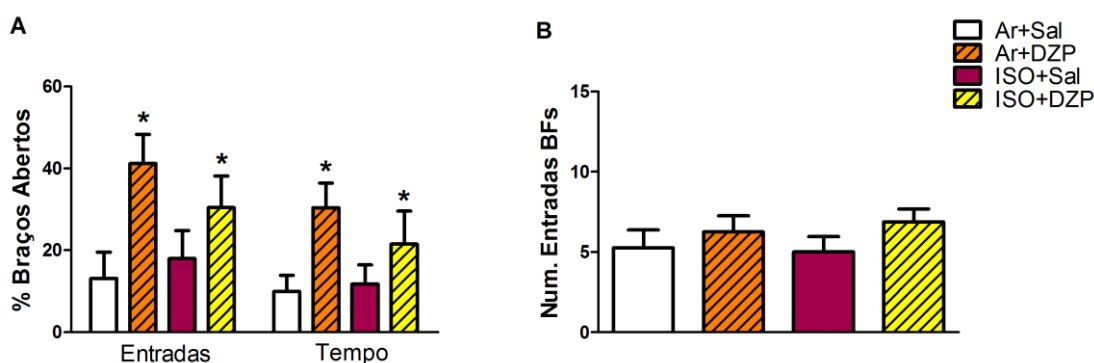


Figura 18 – Comportamento de ratos expostos ao LCE. (A) Porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e (B) número de entradas nos braços fechados (BFs) com ar-salina (Ar-Sal, n=8); ar-diazepam 2,5mg/kg (Ar-DZP, n=8) isoflurano 4,0% (após indução mantido a 2%)-salina (ISO-Sal, n=8); isoflurano 4,0% (após indução mantido a 2%)-diazepam 2,5 mg/kg (ISO-DZP, n=8). * $p<0,05$ comparado com o grupo Ar-Sal (ANOVA seguida de Duncan).

Os dados do CA são mostrados nas tabelas 2, 3 e 4. Não houve alteração na distância total percorrida para os animais tratados com tribromoetanol 2 horas [$F_{(3,41)}=1,402;p=0,256$] ou 7 dias [$F_{(3,30)}=1,826;p=1,164$] após a aplicação (Tabela 2). O controle positivo diazepam também não alterou a distância total percorrida 2 horas [$t=0,627;p=0,537$] ou 7 dias após a aplicação [$t=1,504;p=0,155$] em relação ao grupo salina. Já o hidrato de cloral 400mg/kg reduziu a distância percorrida [$F_{(3,24)}=8,242;p<0,001$] 2h após a administração do anestésico quando comparado ao grupo salina (Duncan, $p<0,05$), enquanto não houve diferença

estatisticamente significativa 7 dias após a administração desse anestésico [$F_{(3,24)}=0,491$; $p=0,692$]. O tiopental não afetou a distância total percorrida no CA 2h [$F_{(3,34)}=2,148$; $p=0,112$] ou 7 dias [$F_{(3,28)}=0,528$; $p=0,667$] após a administração desse barbitúrico. O Isoflurano também não afetou a distância percorrida no CA 2h [$F_{(3,24)}=0,405$; $p=0,751$] ou 7 dias [$F_{(3,23)}=1,581$; $p=0,221$] após sua administração.

Tabela 2 – Distância percorrida no Campo Aberto (em m) por ratos 2 horas após a administração do anestésico.

Anestésico	Distância Total Percorrida (m) ^a
2 horas após aplicação	
Salina (n=15)	20.5 ± 1.3
Diazepam 2,5mg (n=9)	20.7 ± 3.2
Tribromoetanol 40mg/kg (n=9)	18.5 ± 2.8
Tribromoetanol 90mg/kg (n=12)	17.7 ± 1.7
Tribromoetanol 250mg/kg (n=9)	14.2 ± 3.3
Salina (n=8)	14.7 ± 2.1
Hidrato de Cloral 50mg/kg (n=12)	20.2 ± 1.7
Hidrato de Cloral 150mg/kg (n=10)	20.5 ± 1.6
Hidrato de Cloral 400mg/kg (n=7)	7.4 ± 2.7*
Salina (n=10)	20.3±1.7
Tiopental 05mg/kg (n=10)	19.2±2.0
Tiopental 15mg/kg (n=10)	17.6±2.3
Tiopental 40mg/kg (n=7)	11.4±4.1
Ar (n=7)	19,16±3,1
Isoflurano 0,5% (n=7)	17,31±3,0
Isoflurano 1,5% (n=7)	15,31±1,9
Isoflurano 4,0% (n=7)	18,26±1,9

a Dados representados como média ±EPM

* $p<0,05$ quando comparado com salina.

Não houve alteração na distância total percorrida no CA com a administração de diazepam [$F_{(1,35)}=2,880$; $p=0,990$], de tiopental [$F_{(1,35)}=0,251$; $p=0,271$] ou interação entre os dois tratamentos [$F_{(1,35)}=1,183$; $p=0,284$] nos animais que receberam diazepam 7 dias após a administração de tiopental. Também não

houve efeito do diazepam [$F_{(1,28)}=0,558;p=0,461$], houve efeito do isoflurano [$F_{(1,28)}=4,625;p=0,040$] e não houve interação entre os tratamentos [$F_{(1,28)}=0,018;p=0,895$] nos animais que receberam diazepam 7 dias após a administração do isoflurano.

Tabela 3 – Distância percorrida no Campo Aberto (em m) por ratos 7 dias após a administração do anestésico.

Anestésico	Distância Total Percorrida (m) ^a
7 dias após aplicação	
Salina (n=10)	21.6 ± 1.7
Diazepam 2,5mg (n=6)	17.4 ± 2.0
Tribromoetanol 40mg/kg (n=8)	19.2 ± 2.1
Tribromoetanol 90mg/kg (n=8)	15.8 ± 2.1
Tribromoetanol 250mg/kg (n=8)	15.8 ± 2.6
Salina (n=7)	18.6 ± 3,3
Hidrato de Cloral 50mg/kg (n=8)	19.9 ± 3,0
Hidrato de Cloral 150mg/kg (n=7)	22.6 ± 2,7
Hidrato de Cloral 400mg/kg (n=6)	17.4 ± 3.0
Salina (n=8)	22.7 ± 1.5
Tiopental 05mg/kg (n=8)	22.1 ± 2.4
Tiopental 15mg/kg (n=8)	20.4 ± 2.1
Tiopental 40mg/kg (n=8)	19.4 ± 2.0
Ar (n=7)	20,8 ± 2,4
Isoflurano 0,5% (n=6)	16,1 ± 1,9
Isoflurano 1,5% (n=7)	20,5 ± 1,4
Isoflurano 4,0% (n=7)	16,2 ± 2,1

a Dados representados como média ±EPM

*p<0,05 quando comparado com salina.

Tabela 4 – Distância percorrida no Campo Aberto (em m) por ratos tratados com diazepam ou salina 7 dias após a administração do anestésico.

Anestésico	Distância Total Percorrida (m) ^a
Tratamento com anestésico e ansiolítico	
Sal-Sal (n=11)	15,1 ± 3,1
Sal-DZP (n=10)	22,1 ± 3,2
TIO-Sal (n=8)	14,6 ± 3,2
TIO-DZP (n=10)	16,5 ± 2,7
Ar-Sal (n=8)	13,9 ± 3,5
Ar-DZP (n=8)	17,4 ± 2,1
ISO-Sal (n=8)	20,7 ± 1,8
ISO-DZP (n=8)	23,3 ± 4,7

^a Dados representados como média ±EPM

*p<0,05 quando comparado com salina.

5 DISCUSSÃO

As doses anestésicas do tribromoetanol e do hidrato de cloral induziram um efeito tipo ansiogênico e ansiolítico no LCE, respectivamente, 7 dias após uma única injeção. Já o tiopental na dose anestésica provocou um efeito tipo-antidepressivo somente de forma aguda, ou seja, transiente. Além disso, uma dose subanestésica do tribromoetanol aumentou a exploração dos BAs do LCE agudamente, sugerindo um efeito ansiolítico agudo. Ainda, uma dose subanestésica do hidrato de cloral reduziu o tempo e a frequência de imobilidade apenas 2 horas após sua administração, sugerindo um efeito tipo-antidepressivo agudo. Por outro lado, o isoflurano não apresentou efeito no TNF e no LCE.

As doses anestésicas do tribromoetanol, do hidrato de cloral, tiopental e do isoflurano, administradas 7 dias antes do teste, não interferiram na detecção do efeito tipo-antidepressivo da imipramina no TNF. No mesmo sentido, as doses anestésicas do tiopental e do isoflurano, aplicadas 7 dias antes, também não atrapalharam a detecção do efeito ansiolítico do diazepam observado no LCE. Um resumo dos resultados se encontra na tabela 5

Tabela 5 – Efeito dos anestésicos avaliados

Anestésicos analisados	Dose	Efeito
Tribromoetanol	Subanestésica	Ansiolítico agudo
	Anestésica	Ansiogênico tardio
Hidrato de Cloral	Subanestésica	Antidepressivo agudo
	Anestésica	Ansiolítico agudo e persistente
Tiopental	Subanestésica	Não apresentou efeito
	Anestésica	Antidepressivo agudo
Isoflurano	Subanestésica	Não apresentou efeito
	Anestésica	Não apresentou efeito
TBE+IMI	Anestésica	Não interferiu no efeito do antidepressivo
HCL+IMI	Anestésica	Não interferiu no efeito do antidepressivo
TIO+IMI	Anestésica	Não interferiu no efeito do antidepressivo
TIO+DZP	Anestésica	Não interferiu no efeito do ansiolítico
ISO+DZP	Anestésica	Não interferiu no efeito do ansiolítico

5.1 TRIBROMOETANOL

O tribromoetanol não alterou o comportamento dos ratos no TNF 2 horas ou 7 dias após a aplicação. Entretanto, podemos afastar a possibilidade de um resultado falso negativo, já que a imipramina (controle positivo), um antidepressivo clássico, reduziu o tempo e a frequência de imobilidade, ou seja, induziu efeito tipo-antidepressivo nesse experimento. Esse resultado sugere que o tribromoetanol pode ser utilizado em cirurgias que precedem testes comportamentais para drogas com efeito na depressão. Além disso, a dose anestésica do tribromoetanol também não alterou o efeito da imipramina no TNF quando administrado 7 dias antes da aplicação desse antidepressivo, reforçando assim que o tiopental parece não afetar a detecção do efeito antidepressivo e que, pelo menos após uma única administração, o tribromoetanol não interfere na avaliação do comportamento no TNF. Nenhuma das doses de tribromoetanol testadas alteraram a distância percorrida no CA, sugerindo que não houve comprometimento da atividade locomotora que poderia influenciar nos comportamentos avaliados.

Um outro álcool anestésico testado em nosso estudo, o hidrato de cloral, induziu efeito tipo-antidepressivo quando testado no TNF na dose subanestésica agudamente. Uma das hipóteses para explicar a diferença no efeito dos dois alcóois é que, apesar do tribromoetanol e do hidrato de cloral serem alcóois primários, eles apresentam radicais diferentes, bromo e cloreto respectivamente.

A dose subanestésica (90mg/kg) de tribromoetanol induziu efeito tipo-ansiolítico agudo de forma semelhante ao controle positivo diazepam. Concordando com os nossos resultados, Acevedo e colaboradores (2014) mostraram que a administração de forma aguda de baixas doses de outro álcool primário, o etanol, em ratos aumentou o número de entradas nos braços abertos do LCE e o tempo de permanência no compartimento claro do teste de transição claro-escuro, sugerindo um efeito ansiolítico agudo.

O tribromoetanol parece potencializar correntes inibitórias através de receptores GABA_A (ZIMMERMAN et al, 1994; THOMPSON; WAFFORD, 2001; KRASOWSKI; HARRISON, 2000), de forma semelhante aos benzodiazepínicos usados clinicamente como ansiolíticos (MÖHLER et al. 2002). Assim, o possível efeito ansiolítico apresentado por esse anestésico pode estar relacionado ao aumento de correntes inibitórias mediadas por GABA_A, que por sua vez podem controlar a

neurotransmissão serotoninérgica em estruturas relacionadas a ansiedade (JUDGE et al. 2006). Assim, o tribromoetanol pode ser alvo de futuros estudos para elucidar mecanismos de ação de fármacos com efeito na ansiedade.

Além disso, foi mostrado que outros alcoóis primários de cadeia curta como o etanol diminuem as correntes de Cl mediadas por receptores 5HT_{2A} *in vitro* (MINAMI; HARRIS, 1997). Foi proposto por Deakin e Graeff que o bloqueio desses receptores no núcleo dorsal da rafe e nas estruturas que recebem projeções desse núcleo, como a amígdala e córtex, está relacionado com o efeito ansiolítico de diversas drogas. Assim, diferentes neurotransmissores poderiam explicar o possível efeito ansiolítico do tribromoetanol observado no nosso estudo.

Por outro lado, a dose anestésica do tribromoetanol reduziu as entradas nos braços abertos no LCE 7 dias após o tratamento, sugerindo que a anestesia com tribromoetanol induz um efeito ansiogênico tardio. Acevedo e colaboradores (2014), mostraram que a administração de altas doses de etanol levou a uma diminuição no tempo de permanência no compartimento claro do teste claro-escuro, sugerindo um efeito ansiogênico agudo. Dessa forma, a anestesia com tribromoetanol parece não ser adequada em cirurgias que precedem testes comportamentais que detectam efeito de drogas na ansiedade, por potencialmente interferir nesses testes.

Diante das condições de tratamento (uma única dose) aqui utilizadas, os resultados sugerem que o tribromoetanol não é um anestésico ideal para ser utilizado em cirurgias que precedem testes de ansiedade, já que demonstrou um efeito ansiogênico tardio que pode interferir na interpretação de resultados de drogas com possível efeito na ansiedade. Porém, como o tribromoetanol não afetou o comportamento no TNF, os resultados encontrados apontam que esse anestésico pode ser utilizado em cirurgias que precedem testes para drogas com efeito na depressão.

Apesar de o tribromoetanol ser um bom anestésico para indução da anestesia, (PEKNY et al., 2014), uma única dose anestésica (250mg/kg) de tribromoetanol gera anestesia suficiente somente para procedimentos de curta duração (15 min. aproximadamente.) (MEYER & FISH, 2005). Além disso, esse anestésico parece não ser seguro para uso repetido em roedores, uma vez que o seu uso vem sendo associado com toxicidade abdominal nesses animais (ZELLER et al., 1998;

MAHERAS; GOW, 2013). Assim, o seu uso deve ser avaliado levando em consideração as diferentes circunstâncias experimentais em cirurgias laboratoriais.

5.2 HIDRATO DE CLORAL

A dose anestésica de hidrato de cloral não afetou os parâmetros avaliados no TNF e quando administrada 7 dias antes do teste não interferiu no efeito antidepressivo da imipramina no TNF. Esses resultados sugerem que o hidrato de cloral pode ser utilizado como anestésico em cirurgias que precedem testes comportamentais preditivos para drogas com efeito na depressão, uma vez que a dose anestésica parece não afetar a interpretação dos resultados quando uma droga com efeito antidepressivo é utilizada.

Os animais que receberam o hidrato de cloral na dose anestésica apresentaram uma diminuição na distância percorrida no CA quando testados 2h após a administração do anestésico, sugerindo prejuízo na atividade locomotora dos animais. Esse prejuízo parece não interferir nos resultados do LCE, já que os animais exploraram mais os braços abertos e não houve alteração no número de entradas nos braços fechados do LCE, essa última medida considerada um indicativo da atividade locomotora (CRUZ et al. 1994). As demais doses de hidrato de cloral não interferiram na distância percorrida no CA.

Somente a dose subanestésica (150mg/kg) de hidrato de cloral induziu efeito tipo-antidepressivo no TNF 2 h após sua administração. O hidrato de cloral diminuiu o tempo de imobilidade no TNF, sugerindo um efeito tipo antidepressivo agudo. Porém, houve somente uma tendência a diminuição da frequência de imobilidade, e esse anestésico não afetou a frequência de escalada ou natação. Como o aumento da frequência de escalada parece ser mediado pela neurotransmissão noradrenérgica e a frequência de natação, mediada pela neurotransmissão serotoninérgica (DETKE et al.1995), esses parâmetros poderiam ajudar a delinear o mecanismo de ação desse anestésico e até mesmo confirmar o efeito antidepressivo em si. Por outro lado, o hidrato de cloral afetou de forma semelhante tanto a frequência de escalada quanto a frequência de natação, assim um possível efeito antidepressivo não seletivo do hidrato de cloral não pode ser descartado.

Concordando com um possível efeito antidepressivo do hidrato de cloral, foi observado que o hidrato de cloral e o seu metabólito ativo tricloroetanol inibem correntes de cálcio via receptores NMDA em cultura de córtex e de hipocampo (FISCHER et al. 2000; PEOPLES; WEIGHT, 1998). A diminuição do excesso de glutamato no hipocampo pode levar a ativação de vias de sinalização como a que envolve o aumento do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, *Brain-derived neurotrophic factor*) (KOIKE et al., 2013), favorecendo o remodelamento neuronal e um possível efeito antidepressivo como o induzido pela cetamina, um anestésico geral com efeito antidepressivo (IADAROLA et al., 2015).

Além disso, o hidrato de cloral aumenta a neurotransmissão inibitória mediada por GABA_A. A neurotransmissão gabaérgica parece exercer um papel regulatório sobre o balanço entre múltiplas neurotransmissões, como as que envolvem as monoaminas que aparecem alteradas em doenças como a depressão (BRAMBILA et al, 2003; PERHSON e SANCHEZ, 2015). Desse modo, o possível efeito antidepressivo do hidrato de cloral poderia ser explicado por diferentes neurotransmissões.

Já no LCE, a dose anestésica do hidrato de cloral induziu efeito tipo-ansiolítico agudo e persistente. Diante disso, os resultados sugerem que o hidrato de cloral não é um anestésico adequado a ser utilizado em cirurgias que precedem testes comportamentais para drogas com efeito na ansiedade.

Concordando com o possível efeito ansiolítico observado aqui, Gladney e colaboradores (1994) mostraram que o hidrato de cloral em uma dose subanestésica aumentou o número de transições no teste claro escuro em camundongos, também sugerindo um efeito ansiolítico agudo dessa droga. Nossos resultados, porém, mostraram o efeito ansiolítico com dose anestésica, sendo que esse efeito se manteve persistente (7 dias após a administração). Além disso, o hidrato de cloral tem sido utilizado como hipnótico-sedativo para pequenos procedimentos e como ansiolítico antes e após cirurgias em crianças (RATNAPALAN, 2014; KIL et al., 2012).

A ação facilitatória do hidrato de cloral em GABA_A explicaria os efeitos ansiolíticos observados, uma vez que os receptores GABA_A são alvo para drogas ansiolíticas (MÖHLER et al, 2002). Adicionalmente, McCardle e Gartside (2012) mostraram um efeito inibitório do hidrato de cloral sobre neurônios serotoninérgicos em fatias do núcleo dorsal da rafe. A diminuição da neurotransmissão serotoninérgica nesse

núcleo e nas estruturas que recebem suas projeções parecem diminuir a ansiedade (GRAEFF et al., 1996).

No uso experimental, o hidrato de cloral gera anestesia efetiva por um tempo prolongado (aproximadamente 2 horas). Assim, o uso desse anestésico é vantajoso pra procedimentos de longa duração, no sentido de que a sua reaplicação pode não ser necessária durante todo o procedimento (FIELD et al. 1993). Por outro lado, o uso desse anestésico vem sendo questionado por ter uma pobre ação analgésica, além de, em doses elevadas, causar irritações abdominais (FIELD et al, 1993; MAHERAS; GOW, 2013). A partir dos nossos resultados, então, adiciona-se como limitação ao seu uso o fato de interferir na ansiedade de forma persistente.

5.3 TIOPIENTAL

Somente a dose anestésica (40mg/kg) do tiopental, um anestésico geral da classe dos barbitúricos, diminuiu o tempo de imobilidade e aumentou a frequência de natação no TNF de forma aguda, sugerindo um efeito tipo-antidepressivo. O aumento da frequência de natação sugere que o efeito tipo antidepressivo desse anestésico pode ser mediado pela serotonina, uma vez que Detke e Lucki (1996) mostraram que inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) aumentam o comportamento de natação no TNF.

Como os animais necessitam de alguns dias de recuperação após as cirurgias antes de serem testados, esses resultados sugerem que o tiopental pode ser utilizado como anestésico em cirurgias que precedem testes comportamentais para drogas com efeito na depressão. Reforçando isso, o tiopental, quando administrado 7 dias antes do tratamento com imipramina, não mostrou efeito nos comportamentos exibidos no TNF e também não interferiu na detecção do efeito antidepressivo dessa droga. Não foi observada alteração na atividade locomotora dos animais que receberam tiopental.

Um dos meios pelo qual o tiopental poderia induzir um possível efeito antidepressivo pode ser por ativação das vias de sinalização como a que envolve o aumento de BDNF, através do bloqueio de receptores NMDA levando a um efeito antidepressivo (KOIKE et al., 2013). Zhan e colaboradores (1998) mostraram que o tiopental inibe correntes de cálcio eliciadas por receptores NMDA em fatias de córtex e de

hipocampo que sofreram isquemia. Também Hu e colaboradores (1997) mostraram que o tiopental diminui a toxicidade do glutamato mediada por receptores NMDA em fatias de hipocampo.

No LCE, o tiopental não provocou nenhuma alteração comportamental, sugerindo que não teve efeito na ansiedade. Assim, o tiopental parece um anestésico adequado a ser utilizado em cirurgias que precedem testes comportamentais para drogas com efeito na ansiedade. Essa hipótese é reforçada pelo resultado de que o tiopental, quando administrado 7 dias antes do tratamento com diazepam, não mostrou efeito no LCE e também não interferiu na detecção do efeito ansiolítico do diazepam.

O pentobarbital, outro barbitúrico, também não mostrou efeito no LCE quando testado agudamente em ratos (LUO et al., 2015), assim como não inibiu o disparo de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe (MCCARDLE & GARTSIDE, 2012). A diminuição da neurotransmissão serotoninérgica nessa estrutura está relacionada à diminuição da ansiedade (GRAEFF et al., 1996). Já em estudos com humanos, Winwood e Jago (1993) não encontraram diferenças significantes em escores de ansiedade em pacientes tratados com tiopental.

Por outro lado, os barbitúricos aumentam correntes inibitórias mediadas por GABA_A (MCCARDLE & GARTSIDE, 2012), o que poderia explicar o efeito ansiolítico agudo do tiopental em ratos testados na esquiava de uma via observado por Torres e colaboradores (1996). Também foi observado uma melhora em escores de depressão e ansiedade em pacientes que utilizaram tiopental como anestésico (KUSCU et al., 2015).

O tiopental, por ser um anestésico de ação ultra curta, é ideal para indução da anestesia geral. Por outro lado, quando é utilizado como único anestésico durante um procedimento cirúrgico em animais, muitas vezes é necessário que seja aplicado diversas vezes (YASHIKI et al., 1987; SUMITRA et al., 2004). Por ser um barbitúrico, pode ser letal quando administrado em doses acima da janela terapêutica, o que pode acontecer se for reaplicado mais de uma vez durante um procedimento. Por outro lado, como a dose anestésica o tiopental não alterou o comportamento, e seu uso em doses terapêuticas apresenta baixo risco, dentre os anestésicos testados ele se mostrou um anestésico adequado para cirurgias estereotáxicas que precedem testes relacionados à depressão e ansiedade.

5.4 ISOFLURANO

Nenhuma das concentrações testadas de isoflurano alterou o comportamento dos ratos no TNF ou no LCE, tanto 2 horas quanto 7 dias após sua administração. O isoflurano não alterou a atividade locomotora no CA.

Os resultados encontrados sugerem que o isoflurano pode ser utilizado como anestésico em cirurgias que precedem testes comportamentais tanto para drogas com efeito na depressão como para drogas com efeito na ansiedade. Corroborando com isso, quando administrado 7 dias antes da aplicação da imipramina ou do diazepam, não interferiu na detecção dos efeitos antidepressivo ou ansiolítico dessas drogas, respectivamente, no TNF ou LCE.

Yonezaki et al. (2015), utilizando doses anestésicas do isoflurano em camundongos, não observaram efeito do tipo-antidepressivo no TNF de forma tardia, concordando assim com nossos resultados no TNF 7 dias após a administração. Em contrapartida, Antila e colaboradores (2014) mostraram que a anestesia com isoflurano promoveu efeito do tipo antidepressivo de forma aguda e persistente no TNF, enquanto Wang et al. (2012) mostraram efeito tipo antidepressivo no desamparo aprendido em animais tratados cronicamente com isoflurano. O isoflurano foi visto também melhorando escores de depressão em pacientes tratados cronicamente com esse anestésico. (WEEKS et al., 2013)

Concordando também com nossos resultados na ansiedade, Yonezaki e colaboradores (2015) mostraram que o isoflurano não apresentou efeito tipo ansiolítico no LCE ou no teste claro-escuro de forma tardia. Porém, um estudo feito com outros anestésicos voláteis, como o sevoflurano, halotano e desflurano administrados em ratos, mostrou efeito do tipo ansiogênico no LCE após exposição crônica a doses subanestésicas desses anestésicos (OZER et al., 2006).

Os trabalhos descritos acima mostram que os possíveis efeitos do isoflurano na depressão ou em estruturas relacionadas a esse comportamento ocorreram após repetidas exposições ou longas exposições (uma hora ou mais) dos animais a esse anestésico. Como o tempo em que os animais desse estudo ficaram expostos ao isoflurano foi curto (20 minutos), pode ser que esse tempo de exposição ao

anestésico não tenha sido suficiente para causar alguma alteração nos comportamentos exibidos no TNF ou no LCE.

O isoflurano, por ser um anestésico inalatório volátil, permite o controle adequado da profundidade da anestesia, além de rápida recuperação. Dessa forma, o isoflurano tem sido um anestésico de escolha tanto para procedimentos de curta quanto de longa duração (GARGIULO et al., 2012). Além disso, tem se mostrado um anestésico seguro para uso em experimentação animal (MAUD et al., 2014; ZAUSINGER et al., 2002; LEE et al., 2008). Somado a isso, o isoflurano se mostrou um anestésico adequado para a utilização em cirurgias que antecedem testes relacionados à depressão e à ansiedade, já que esse anestésico não apresentou nenhum efeito nos comportamentos aqui avaliados.

5.5 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Diante dos resultados aqui encontrados, os anestésicos gerais tiopental e isoflurano, que não afetaram o comportamento dos ratos 7 dias após a sua administração, se mostraram ideais para utilização em cirurgias que precedem testes comportamentais para drogas com efeito na depressão e ansiedade. Porém, é importante considerar que a ausência de alterações ocorreu após uma única administração do tiopental ou curta exposição (20 minutos) do rato ao isoflurano. Isso é uma limitação, uma vez que alguns procedimentos necessitam de reaplicação do anestésico ou manutenção da anestesia inalatória por um período maior que o testado aqui. Também é importante considerar que os testes foram feitos em animais ingênuos, ou seja, que não passaram por cirurgia. O procedimento experimental empregado em nosso estudo atende às expectativas de uma cirurgia estereotáxica simples praticada em laboratórios de psicofarmacologia.

Apesar de não terem afetado o comportamento de forma tardia, o tiopental e o isoflurano apresentam algumas limitações quanto ao seu uso em geral. O tiopental é um barbitúrico que pode causar severa depressão respiratória, além de ter a duração de ação muito curta, podendo ser necessária à sua reaplicação durante o procedimento. Já a profundidade da anestesia com isoflurano pode ser controlada a todo momento pela regulação da sua concentração via aparelho de anestesia inalatória. Por outro lado, a necessidade de um aparelho para a administração do

anestésico eleva o custo e praticidade da anestesia. Assim, devem ser levados em consideração diversos fatores para a escolha do anestésico a ser empregado, como o efeito sobre o comportamento, fatores fisiológicos, disponibilidade de equipamentos, dentre outros, dependendo das diferentes condições experimentais.

Em nosso estudo, foi utilizado somente um teste comportamental relacionado à depressão e um para ansiedade. Para confirmar qual o melhor anestésico geral a ser utilizado em cirurgias que precedem testes comportamentais é necessário que sejam feitos estudos adicionais empregando outros testes. Além disso, estudos comportamentais com os anestésicos analisados são limitados, ressaltando a necessidade de investigações futuras no comportamento com anestésicos gerais.

6 CONCLUSÃO

Os nossos resultados sugerem que:

- O tribromoetanol e o hidrato de cloral são anestésicos impróprios para cirurgias que precedem testes comportamentais que envolvam ansiedade devido aos seus efeitos comportamentais mesmo 7 dias após a sua aplicação.
- O tiopental e o isoflurano parecem ser adequados para essa situação, uma vez que o tiopental alterou o comportamento somente de forma aguda, enquanto o isoflurano não teve efeito nos testes que avaliam comportamentos relacionados à depressão e à ansiedade. A segurança no uso desses anestésicos em procedimentos que precedem os testes comportamentais também é apoiada pelo resultado de que a detecção do efeito antidepressivo ou ansiolítico de drogas também parece não ser influenciado pelo uso desses anestésicos.
- Além disso, o possível efeito tipo-antidepressivo ou ansiolítico desses anestésicos sugere que essas drogas podem ser alvo de futuros estudos para desenvolvimento de potenciais novos fármacos para o tratamento de depressão e transtornos de ansiedade.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, M. B. et al. Relationship between ethanol-induced activity and anxiolysis in the open field, elevated plus maze, light-dark box, and ethanol intake in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**, v. 265, p. 203–215, 2014.
- AJADI, R. A. et al. Evaluation of tribromoethanol, tribromoethanol-buprenorphine and ketamine-xylazine combinations for anaesthesia in Sprague-Dawley rats undergoing ovariectomy. **Nigerian journal of physiological sciences : official publication of the Physiological Society of Nigeria**, v. 28, n. 1, p. 51–56, 2013.
- AL-MOUSAWI, A. M. et al. Impact of Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia Technique on the Inflammatory Cytokine Profile in a Rodent Model of Severe Burn Injury. **Shock**, v. 34, n. 3, p. 261–268, 2010.
- ANTILA, H. et al. Isoflurane anesthesia rapidly activates TrkB receptor signaling and produces antidepressant-like behavioral effects. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 8, p. S17, 2014.
- ARON, C. et al. Evaluation of a rapid technique for detecting minor tranquilizers. **Neuropharmacology**, v. 10, n. 4, p. 459–469, 1971.
- ARRAS, M. et al. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. **Comparative medicine**, v. 51, n. 5, p. 443–456, 2001.
- ASANO, T.; OGASAWARA, N. Chloride-dependent stimulation of GABA and benzodiazepine receptor binding by pentobarbital. **Brain Research**, v. 225, n. 1, p. 212–216, 1981.
- BOLLIGER, B; MADDOX, K. Experimental anesthesia with tri-bromethyl alcohol (Avertin) and sodium iso-amyl-ethyl-barbiturate (Amytal). Current Researches in Anesthesia and Analgesia: **Anesthesia & Analgesia**, v. 68, p. 540, 1989.
- BERMAN, R. M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351–354, fev. 2000.
- BRAMBILLA, P. et al. GABAergic dysfunction in mood disorders. **Molecular psychiatry**, n. April, p. 721–737, 2003.
- BUITRAGO, S. et al. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 11–17, 2008.
- CESAROVIC, N. et al. Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. **Laboratory animals**, v. 44, n. 4, p. 329–336, 2010.
- CHIU, W. A. et al. Key scientific issues in the health risk assessment of trichloroethylene. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 9, p. 1445–1449, 2006.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171–176, 1994.
- DETKE, M. J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test the effects of water depth. **Behavioural Brain Research**, v. 73, p. 43–46, 1996.

- DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 66–72, 1995.
- DEWHURST, A. T.; MOORE, S. J.; LIBAN, J. B. Pharmacological agents as cerebral protectants during deep hypothermic circulatory arrest in adult thoracic aortic surgery. **Anaesthesia**, v. 57, n. 10, p. 1016–1021, 2002.
- DICKINSON, R. et al. Competitive Inhibition at the Glycine Site of the N -Methyl- D -aspartate Receptor by the Anesthetics Xenon and Isoflurane. **Anesthesiology**, v. 107, n. 5, p. 756–767, 2007.
- DICKINSON, R.; FRANKS, N. P.; LIEB, W. R. Can the stereoselective effects of the anesthetic isoflurane be accounted for by lipid solubility? **Biophysical journal**, v. 66, n. 6, p. 2019–2023, 1994.
- DONALD R. SANSKI, FRED G. MIHM, MYER H. ROSENTAL, S. M. K. Pharmacokinetics of High-dose Thiopental Used in Cerebral Resuscitation. **anesthesiology**, v. 53, n. 2, p. 169–171, 1980.
- DOWNIE, D. L. et al. The interaction of trichloroethanol with murine recombinant 5-HT₃ receptors. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 8, p. 1641–1651, 1995.
- DOWNIE, D. L.; FRANKS, N. P.; LIEB, W. R. Effects of Thiopental and its optical isomers on Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Anesthesiology**, v. 93, p. PL 774–83, 2000.
- EL-MAS, M. M.; ABDEL-RAHMAN, A A. Contrasting effects of urethane, ketamine, and thiopental anesthesia on ethanol-clonidine hemodynamic interaction. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 21, n. 1, p. 19–27, 1997.
- ENGIN, E.; TREIT, D.; DICKSON, C. T. Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. **Neuroscience**, v. 161, n. 2, p. 359–369, 2009.
- FEDER, A. et al. Efficacy of Intravenous Ketamine for Treatment of Chronic Posttraumatic Stress Disorder A Randomized Clinical Trial. v. 10029, n. 6, p. 681–688, 2015.
- FIELD, K. J.; WHITE, W. J.; LANG, C. M. Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats. **Laboratory animals**, v. 27, p. 258–269, 1993.
- FIELDI, K. J.; WHITE, W. J.; LANG, M. A. X. Anaesthetic effects of chloral hydrate , pentobarbitone urethane in adult male rats c . p. 258–269, 1993.
- FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. “One-trial tolerance” to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? **Psychopharmacology**, v. 110, n. 1-2, p. 240–244, 1993.
- FISCHER, W.; ALLGAIER, C.; ILLES, P. Inhibition by chloral hydrate and trichloroethanol of AMPA-induced Ca²⁺ influx in rat cultured cortical neurones. **European Journal of Pharmacology**, v. 394, n. 1, p. 41–45, 2000.
- FISH, R. E. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. **The Canadian Veterinary Journal**, 1998.
- FLECKNELL, P, A. Animal experimentation. **Baillière’s Clinical Anaesthesiology**, v. 2, p. 175–191, 1988.

- FLECKNELL, P. A. Laboratory Animal Anaesthesia. **Elsevier**, 2009
- FLOOD, P.; KRASOWSKI, M. D. Intravenous anesthetics differentially modulate ligand-gated Ion Channels. **Anesthesiology**, v. 92, n. 5, p. 1418–1425, 2000.
- GARGIULO, S. et al. Mice Anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. **The Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v. 53, n. 1, p. 55–69, 2012.
- GEPTS, E.; CAMU, F. Pharmacokinetics of intravenous induction agents. **Baillière's Clinical Anaesthesiology**, v. 5, n. 3, p. 513–542, 1991.
- GLADNEY, M.; STANLEY, R. T.; HENDRICKS, S. E. Anxiolytic activity of chloral hydrate and hydroxyzine. **Pediatric dentistry**, v. 16, n. 3, p. 183–189, 1994.
- GONCA, E. Comparison of thiopental and ketamine+xylazine anesthesia in ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in rats. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 45, n. 6, p. 1413–1420, 2015.
- GOPALAN, C. et al. Tribromoethanol-medetomidine combination provides a safe and reversible anesthetic effect in Sprague-Dawley rats. **Contemporary topics in laboratory animal science / American Association for Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 7–10, 2005.
- GRAEFF, F. G. et al. Role of 5-HT in Stress , Anxiety , and Depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 129–141, 1996.
- HAEFELY, W. E. Synaptic pharmacology of barbiturates and benzodiazepines. **Agents and actions**, v. 7, n. 3, p. 353–359, 1977.
- HALEY, T. J.; GIDLEY, J. T. Pharmacological comparison of R(+), S(-) and racemic thiopentone in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 211–214, 1976.
- HARRIS, B. et al. Deep Hypothermia and the Vascular Response to Thiopental. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 20, n. 5, p. 678–683, 2006.
- HARRISON, N. L. et al. Positive modulation of human gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors by the inhalation anesthetic isoflurane. **Molecular pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 628–632, 1993.
- IADAROLA, N. D. et al. Ketamine and other N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in the treatment of depression: a perspective review. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 6, n. 3, p. 97–114, 2015.
- IRWIN, S. A; IGLEWICZ, A. Oral ketamine for the rapid treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care. **Journal of palliative medicine**, v. 13, n. 7, p. 903–908, 2010.
- JANSSEN, B. J. A et al. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 287, n. 4, p. H1618–H1624, 2004.
- JUDGE, S. J.; YOUNG, R. L.; GARTSIDE, S. E. GABAA receptor modulation of 5-HT neuronal firing in the median raphe nucleus: Implications for the action of anxiolytics. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 8, p. 612–619, 2006.
- KIL, H. K. et al. Psychological and behavioral effects of chloral hydrate in day-case

pediatric surgery: a randomized, observer-blinded study. **Journal of pediatric surgery**, v. 47, n. 8, p. 1592–9, ago. 2012.

KING, A.; LITTLE, J. C. Thiopentone Treatment of the Phobic Anxiety-depersonalization Syndrome Proceedings of the Royal Society of Medicine. **Psychotherapy**, p. 595–596, 1954.

KOIKE, H. et al. Role of BDNF / TrkB signaling in antidepressant-like effects of a group II metabotropic glutamate receptor antagonist in animal models of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 238, p. 48–52, 2013.

KOSE, E. A. et al. Neuroprotective effects of racemic ketamine and (S)-ketamine on spinal cord injury in rat. **Injury**, v. 43, n. 7, p. 1124–1130, 2012.

KRASOWSKI, M. D.; HARRISON, N. L. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 10, p. 1278–1303, 1999.

KRASOWSKI, M. D.; HARRISON, N. L. The actions of ether, alcohol and alkane general anaesthetics on GABAA and glycine receptors and the effects of TM2 and TM3 mutations. **British journal of pharmacology**, v. 129, n. 4, p. 731–743, 2000.

KUSHIKATA, T. et al. Role of coerulean noradrenergic neurones in general anaesthesia in rats. **British Journal of Anaesthesia**, v. 107, n. 6, p. 924–929, 2011.

LAURENT, Y. et al. Electrocardiographic changes with segmental akinesia after chloral hydrate overdose. **Journal of Emergency Medicine**, v. 30, n. 2, p. 179–182, 2006.

LEE, J. J. et al. Postconditioning with isoflurane reduced ischemia-induced brain injury in rats. **Anesthesiology**, v. 108, n. 6, p. 1055–1062, 2008.

LI, L.; ZUO, Z. Isoflurane preconditioning improves short-term and long-term neurological outcome after focal brain ischemia in adult rats. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 497–506, 2009.

LIEGGI, C. C. et al. An evaluation of preparation methods and storage conditions of tribromoethanol. **Contemporary topics in laboratory animal science / American Association for Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 11–16, 2005.

LOVINGER, D. M. et al. Trichloroethanol potentiates synaptic transmission mediated by gamma-aminobutyric acidA receptors in hippocampal neurons. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 264, n. 3, p. 1097–1103, 1993.

LUO, C. et al. Differential effects of general anesthetics on anxiety-like behavior in formalin-induced pain: Involvement of ERK activation in the anterior cingulate cortex. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 24, p. 4433–4444, 2015.

YASHIKI, C; KOJIMA, T; OKAMOTO, I. Toxicological Study on Intravenous Thiopental Anesthesia - Interrelation Between Rate of Injection and Distribution of Thiopental. **Forensic Science International**, n. 33, p. 169–175, 1987.

MAENG, S. et al. Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 349–352, 2008.

MAHERAS, K. J.; GOW, A. Increased anesthesia time using 2,2,2-tribromoethanol-chloral hydrate with low impact on mouse psychoacoustics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 219, n. 1, p. 61–69, 2013.

- MAUD, P. et al. Evidence for the use of isoflurane as a replacement for chloral hydrate anesthesia in experimental stroke: An ethical issue. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- MCCARDLE, C. E.; GARTSIDE, S. E. Effects of general anaesthetics on 5-HT neuronal activity in the dorsal raphe nucleus. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 4, p. 1787–96, mar. 2012.
- MEYER, R. E.; FISH, R. E. A review of tribromoethanol anesthesia for production of genetically engineered mice and rats. **Lab animal**, v. 34, n. 10, p. 47–52, 2005.
- MEZADRI, T. J. et al. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 200–205, 2011.
- MIHIC, S. J. et al. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. **Nature**, v. 389, n. 6649, p. 385–389, 1997.
- MINAMI, K.; MINAMI, M.; HARRIS, R. A. Inhibition of 5-Hydroxytryptamine Type 2A Receptor-Induced Currents by n -Alcohols and Anesthetics 1. v. 281, n. 3, p. 1136–1143, 1997.
- MÖHLER, H.; FRITSCHY, J. M.; RUDOLPH, U. A new benzodiazepine pharmacology. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 300, n. 1, p. 2–8, 2002.
- MOODY, E. J.; HARRIS, B. D.; SKOLNICK, P. Stereospecific actions of the inhalation anesthetic isoflurane at the GABAA receptor complex. **Brain research**, v. 615, n. 1, p. 101–106, 1993.
- OZER, M. et al. Behavioural effects of chronic exposure to sub- anesthetic concentrations of halothane, sevoflu- rane and desflurane in rats. **General Anesthesia**, v. 53, n. 7, p. 653–658, 2006.
- OZKAN, K. O. et al. Effect of Ketamine, Thiopental and Ketamine–Thiopental Combination during Electroconvulsive Therapy for Depression. **Turkish Journal of Anesthesia and Reanimation**, v. 43, n. 5, p. 313–317, 2015.
- PACHON, R. E. et al. Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 308, n. 12, p. H1525–9, 2015.
- PAPAIIOANNOU, V. E.; FOX, J. G. Efficacy of tribromoethanol anesthesia in mice. **Laboratory animal science**, v. 43, n. 2, p. 189–92, 1993.
- PASTUSZKO, A. Action of barbiturates on activity of acetylcholinesterase from synaptosomal membranes. **Neurochemical Research**, v. 5, n. 7, p. 769–776, jul. 1980.
- PEHRSON, A. L.; SANCHEZ, C. Altered γ -aminobutyric acid neurotransmission in major depressive disorder: a critical review of the supporting evidence and the influence of serotonergic antidepressants. **drug design, development and Therapy**, p. 603–624, 2015.
- PEKNY, T. et al. Short general anaesthesia induces prolonged changes in gene expression in the mouse hippocampus. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 58, n. 9, p. 1127–1133, 2014.
- PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as

a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PEOPLES, R. W.; WEIGHT, F. F. Inhibition of excitatory amino acid-activated currents by trichloroethanol and trifluoroethanol in mouse hippocampal neurones. **Br.J.Pharmacol.**, v. 124, n. 6, p. 1159–1164, 1998.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, fev. 1978.

POSSAMAI, F. et al. Influence of enrichment on behavioral and neurogenic effects of antidepressants in Wistar rats submitted to repeated forced swim test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 58, p. 15–21, 2014.

PRUHS, R. J.; KALBFLEISCH, J. H.; QUOCK, R. M. Combination Effects of Chloral Hydrate and Nitrous Oxide/Oxygen in the Mouse Staircase Test. **Anesthesia progress**, v. 35, n. 3, p. 116–120, 1988.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3–33, 2003.

RATNAPALAN, S. Chloral hydrate sedation in children. **Clinical Pediatrics**, v. 53, n. 10, p. 933–936, 2014. z

REID, W. C. et al. Pathologic changes associated with use of tribromoethanol (avertin) in the Sprague Dawley rat. **Laboratory animal science**, v. 49, n. 6, p. 665–667, 1999.

ROTH, D. M. et al. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. **American journal of physiologyHeart and circulatory physiology.**, v. 282, n. 6, p. H2134–40, 2002.

SILOTE, G. P. **Investigação dos efeitos comportamentais da ketamina em ratos expostos ao labirinto em T elevado: estudo comparativo com outro antagonista NMDA, o MK-801.** [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.

SILOTE, G. P. et al. Infusion of galanin into the mid-caudal portion of the dorsal raphe nucleus has an anxiolytic effect on rats in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 252, p. 312–317, 2013.

SING, K. et al. Chloral hydrate toxicity from oral and intravenous administration. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, v. 34, n. 1, p. 101–106, 1996.

SMITH, W. Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. **Laboratory Animals**, v. 27, n. 1, p. 30–39, 1 jan. 1993.

STOKES, E. L.; FLECKNELL, P. A; RICHARDSON, C. A. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. **Laboratory animals**, v. 43, n. 2, p. 149–154, 2009.

SUMITRA, M. et al. Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats - A comparative analysis. **Life Sciences**, v. 75, n. 15, p. 1887–1896, 2004.

TAGAWA, T.; SAKURABA, S. Sevoflurane in combination with propofol , not thiopental , induces a more robust neuroapoptosis than sevoflurane alone in the neonatal mouse brain. 2014.

TANELIAN D L, KOSEK P, MODY I, M. B. The Role of the GABA_A Receptor/Chloride Channel Complex in Anesthesia. 1993.

THOMPSON, S. A; WAFFORD, K. Mechanism of action of general anaesthetics--new information from molecular pharmacology. **Current opinion in pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 78–83, 2001.

TORRES, C. et al. Successive negative contrast in one-way avoidance: effect of thiopental sodium and chlorpromazine Carmen. **European Journal of Pharmacology**, v. 314, p. 269–275, 1996.

VACHON, P. et al. A pathophysiological study of abdominal organs following intraperitoneal injections of chloral hydrate in rats: comparison between two anaesthesia protocols. **Laboratory animals**, v. 34, n. 1, p. 84–90, 2000.

VIOLET J. M., DOWNIE D. L., NAKISA R. C, LIEB W. R., F. N. . Violet, 1997_ Ação do isoflurano em receptores nicotínicos.pdf. **Anesthesiology**, v. 86, n. 4, p. 866–874, 1997.

WANG, L. et al. Isoflurane impedes the development of a depression-like phenotype in rats. **Neuroscience**, 2012.

WEEKS, H. R. et al. Antidepressant and Neurocognitive Effects of Isoflurane Anesthesia versus Electroconvulsive Therapy in Refractory Depression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2013.

WINWOOD, M. .; JAGO, R. H. Anxiety levels following anaesthesia for day-case surgery. **Anaesthesia**, v. 48, n. 5, p. 581–584, 1993.

YILMAZ, A et al. Prolonged effect of an anesthetic dose of ketamine on behavioral despair. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 1-2, p. 341–344, 2002.

YONEZAKI, K. et al. Postanesthetic Effects of Isoflurane on Behavioral Phenotypes of Adult Male C57BL/6J Mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0122118, 2015.

YOSHIDA, S. et al. An inhalation anesthetic device for stereotaxic operation on mouse pups. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 243, p. 63–67, 2015.

ZARATE, C. A. J. et al. A Randomized Trial of an N-methyl-D-aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, p. 856–864, 2006.

ZAUSINGER, S.; BAETHMANN, A.; SCHMID-ELSAESSER, R. Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: Mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. **Brain Research Protocols**, v. 9, n. 2, p. 112–121, 2002.

ZELLER, W. et al. Adverse effects of tribromoethanol as used In the production of transgenic mice. p. 407–413, 1998.

ZHAN, R. Z. et al. Thiopental Inhibits Increases in Ca²⁺ Induced by Membrane Depolarization, NMDA Receptor Activation, and Ischemia in Rat Hippocampal and Cortical Slices. **Anesthesiology**, v. 89, n. 2, p. 456–466, 1998.

ZHANG, H. et al. Crystal structure of isoflurane bound to integrin LFA-1 supports a unified mechanism of volatile anesthetic action in the immune and central nervous systems. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 8, p. 2735–2740, 2009.

ZHU, H.; COTTRELL, J. E.; KASS, I. S. Zhu, 1997_Efeito do tiopental em receptores NMDA e AMPA.pdf. **Anesthesiology**, v. 87, n. 4, p. 944–51, 1997.

ZIMMERMAN, A.; JONES, M. V; HARRISON, N. L. Potentiation of γ -Aminobutyric ACIdA Receptor Correlates with In Vivo Anesthetic Potency1 C1 Current. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 270, n. 3, p. 987–991, 1994.

ZORNIK, M. et al. Comparison of Thiopental , Urethane , and Pentobarbital in the Study of Experimental Cardiology in Rats In Vivo. v. 56, n. 1, p. 38–44, 2010.

ZUURBIER, C. J.; EMONS, V. M.; INCE, C. Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. **American Journal of Physiology-Heart Circulatory Physiology**, v. 282, n. 6, p. H2099–105, 2002.